

**A *Neosartorya fischeri* által termelt defenzinszerű antifungális
protein azonosítása és jellemzése**

PhD értekezés

Készítette:

Kovács Laura

Témavezetők:

Dr. Galgóczi László

tudományos munkatárs

Prof. Dr. Vágvolgyi Csaba

tanszékvezető egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Mikrobiológiai Tanszék

2014

Szeged

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	5
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1. A <i>Neosartorya fischeri</i> általános jellemzése	7
3.2. Az antimikrobiális peptidek	7
3.2.1. Ascomycota gombák defenzinszerű fehérjéi.....	8
3.2.1.1. PAF-klasztert hordozó defenzinszerű proteinek.....	9
3.2.1.1.1. Fehérjeszerkezet.....	10
3.2.1.1.2. Transzkripció szabályozás és expresszió.....	15
3.2.1.1.3. Antifungális spektrum és hatás.....	17
3.2.1.1.4. Hatásmód.....	21
3.2.1.1.5. Biológiai szerep.....	23
3.2.1.1.6. Potenciális alkalmazási lehetőségek.....	25
4. Célkitűzések	28
5. Anyagok és módszerek	29
5.1. A vizsgálatokban szereplő mikroorganizmusok	29
5.2. Alkalmazott tápközegek, tenyésztési körülmények	30
5.2.1. Alkalmazott tápközegek	30
5.2.2. Alkalmazott tenyésztési körülmények	30
5.3. Alkalmazott pufferek, oldatok és reagensek.....	31
5.4. Alkalmazott indítószekvenciák	33
5.5. Alkalmazott módszerek	34
5.5.1. Az NFAP izolálása	34
5.5.1.1. Az NFAP-t kódoló gén és határolórégióinak izolálása	34
5.5.1.2. Az NFAP-t kódoló cDNS izolálása	35
5.5.1.3. Az NFAP izolálása <i>N. fischeri</i> NRRL 181 fermetléből	36
5.5.2. Az NFAP antifungális hatásának vizsgálata	37
5.5.2.1. A gombaspórák csírázókéességének vizsgálata NFAP jelenlétében	37
5.5.2.2. Az NFAP antifungális hatásának vizsgálata <i>A. niger</i> csírázókéességére.....	37
5.5.2.3. Mikroszkópos vizsgálat	38
5.5.2.4. Az NFAP antifungális hatásának pH- és hőmérsékletfüggése, proteináz kezeléssel szembeni stabilitásának vizsgálata.....	38
5.5.3. Az NFAP <i>in silico</i> szerkezetmeghatározása, filogenetikai analízis	38
5.5.3.1. <i>In silico</i> szerkezetvizsgálatok.....	39
5.5.3.2. Filogenetikai analízis	39
5.5.4. Az NFAP hatásmechanizmusának felderítéséhez használt módszerek	40
5.5.4.1. A pLGnfap vektor konstrukciója.....	40
5.5.4.2. Az <i>A. nidulans</i> transzformációja.....	41
5.5.4.3. NFAP expressziója <i>A. nidulans</i> CS2902 törzsben	42
5.5.4.4. A hNFAP antifungális hatásának vizsgálata <i>A. nidulans</i> növekedésére.....	43
5.5.4.5. A hNFAP antifungális hatásának vizsgálata <i>A. nidulans</i> CS2902 transzformánsokra	43
5.5.4.6. Mikroszkópos vizsgálatok	44

5.5.4.7. Az egy- és kétértékű kationok hatásának vizsgálata a hNFAP antifungális aktivitására	45
5.5.5. Az NFAP biológiai szerepének felderítésére használt módszerek	45
5.5.5.1. A <i>Δnfap</i> <i>N. fischeri</i> NRRL 181 törzs előállítása	45
5.5.5.1.1. Lineáris deléciós konstrukció létrehozása.....	45
5.5.5.1.2. A <i>N. fischeri</i> NRRL 181 transzformáció.....	47
5.5.5.1.3. DNS-blottolás és hibridizálás	48
5.5.5.2. A vad típusú és a <i>Δnfap</i> mutáns <i>N. fischeri</i> NRRL 181 növekedésének vizsgálata	50
5.5.5.3. A vad típusú és a <i>Δnfap</i> mutáns <i>N. fischeri</i> NRRL 181 <i>in vitro</i> antagonizmusának vizsgálata...	50
5.5.6. Statisztikai analízis	52
6. Eredmények és értékelés	53
6.1. Az <i>nfap</i> izolálása	53
6.2. <i>In silico</i> vizsgálatok	55
6.3. Az NFAP filogenetikai analízise	57
6.4. Az NFAP izolálása	58
6.5. Az NFAP antifungális tulajdonságai.....	59
6.6. A <i>pLGnfap</i> konstrukciója és az NFAP expressziója <i>A. nidulans</i> -ban.....	65
6.7. A hNFAP antifungális hatása az <i>A. nidulans</i> SZMC 0307 és CS2902 törzsek növekedésére	65
6.8. A hNFAP <i>A. nidulans</i> CS2902 transzformánsra gyakorolt antifungális hatása.....	67
6.9. Az egy- és kétértékű kationok hatása a hNFAP antimikrobiális aktivitására	74
6.10. Az <i>nfap</i> deléciós konstrukciójának szintézise <i>double-joint PCR</i> -rel	75
6.11. A <i>Δnfap</i> mutáns <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 törzs létrehozása	76
6.12. A vad típusú és a <i>Δnfap</i> mutáns <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 növekedésének vizsgálata	77
6.13. A vad típusú és a <i>Δnfap</i> mutáns <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 <i>in vitro</i> antagonizmusa tömlős- és járomspórás gombákkal szemben	78
7. Összefoglalás.....	83
8. Angol nyelvű összefoglaló (<i>Summary in English</i>).....	86
9. Irodalomjegyzék.....	90
10. Köszönetnyilvánítás	99

1. Rövidítések jegyzéke

AcAMP	<i>Aspergillus clavatus</i> ES1 antifungális protein
ACLA	<i>Aspergillus clavatus</i> VR1 antifungális protein
AFP	<i>Aspergillus giganteus</i> MDH 18894 antifungális protein
AFPIM	<i>Antifungal Protein Induction Medium</i> (antifungális proteint indukáló tápközeg)
AFP _{NN5353}	<i>Aspergillus giganteus</i> A3274 antifungális protein
ANAFP	<i>Aspergillus clavatus</i> VR1 antifungális protein
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn</i> , Hollandia
CFW	<i>Calcofluor white</i>
CI	kloroform-izoamilalkohol
CM	<i>Complete Medium</i> (komplett tápközeg)
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DIG	digoxigenin
DMSO	dimetil-szulfoxid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
FPAFP	<i>Fusarium polyphialidicum</i> SZMC 11042 antifungális protein
H ₂ DCFD	2',7'-dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát
hNFAP	heterológ <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 antifungális protein
IMI	<i>CABI Bioscience Genetic Resource Collection</i> , Egyesült Királyság
MEA	<i>Malt Extract Agar</i> (malátás táptalaj)
MES	2-N-morfolino-etánszulfonsav
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i> (minimális gátló koncentráció)
MM	<i>Minimal Medium</i> (minimál tápközeg)
MPK	Mitogén-aktivált protein kináz
NAF	<i>Penicillium nalgiovense</i> BFE 66, 67, 474 antifungális protein
NCAIM	<i>National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms</i> , Magyarország
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFAP	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 antifungális protein

NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory Agricultural Research Service Culture Collection, USA</i>
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176 antifungális protein
PCD	<i>Programmed Cell Death</i> (programozott sejthalál)
PCI	fenol-kloroform-izoamilalkohol
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (polimeráz láncreakció)
PEG	polietilén-glikol
PgAFP	<i>Penicillium chrysogenum</i> RP42C antifungális protein
PI	propídium-jodid
PkC	protein kináz C
RNáz	ribonukleáz
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktív oxigén-fajták)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (nátrium-lauril-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis)
SEM	Szkenning (pásztázó sugaras) elektronmikroszkópia
SH-like aLRT	<i>Shimodaira-Hasegawa-like approximate likelihood ratio test</i>
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i> (nátrium-klorid - nátrium-citrát)
SZMC	<i>Szeged Microbial Collection</i> , Magyarország
TAE	Tris-ecetsav-dinátrium-EDTA
TRIS	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
UAMH	<i>University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium</i> , Kanada
YEPG	<i>Yeast Extract-Peptone-Glucose medium</i> (élesztőkivonat-pepton-glükóz tápközeg)
WAG	<i>Whelan And Goldman substitution model</i>
WRL-CN	<i>Welcome Bacterial Collection</i> , Anglia

A doktori értekezésben előforduló gének, DNS régiók:

<i>gpdA</i>	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén
<i>nfap</i>	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 antifungális protein gén
<i>ptrA</i>	pyrithiamine rezisztencia gén
<i>pUC19</i>	pUC19 vektor
<i>pyr4</i>	<i>Neurospora crassa</i> orotidin-5'-monofoszfát dekarboxiláz gén
<i>trpC</i>	triptofán C gén

2. Bevezetés

Az utóbbi 20 évben jelentősen emelkedett a mikrobiális fertőzések esetszáma. Ennek okát elsősorban a legyengült immunrendszerű betegek növekvő számában, az immunszuppresszív terápia mind gyakoribb alkalmazásában és a széles spektrumú antibiotikumok nem megfelelő használata következtében megjelenő rezisztens (gyakran multidrog-rezisztens) mikroorganizmus-törzsek terjedésében kell keresnünk. Különösen nagymértékű növekedés következett be az opportunist gombafertőzések esetszámában, amikor a legyengült szervezetben egy egészséges emberrel szemben nem patogén gomba kórokozóként tűnik fel. Az ilyen fertőzések kezelése nehézkes, mivel a rendelkezésre álló terápiás szerek száma alacsony, gyakran szűk spektrumúak, számos mellékhatással rendelkeznek és a gazda szervezetét jelentős mértékben károsítják. A növényvédelemnek is komoly gondot jelent a gombák által okozott, a termésveszteség nagy részéért felelős fertőzések és raktári kártevők leküzdése. Az ennek érdekében tett erőfeszítések célja a termésátlag megtartása, annak növelése, illetve a raktári penészkártévők visszaszorítása hatékony antifungális szerek alkalmazásával.

Mindezekből következően szükség van új, antifungális készítmények kifejlesztésére. A penészgombák által termelt, defenzinszerű fehérjék számos tulajdonsága megfelel az újonnan kifejlesztendő, a gyógyászatban és a növényvédelemben használatos gombaellenes szerekkel szemben támasztott legfontosabb követelményeknek; új stratégiai távlatokat nyitva meg a fonalgombák által okozott kártételek elleni védekezésben: Egymástól eltérő módon, hatékonyan gátolják mezőgazdasági, orvosi és élelmiszeripari szempontból káros fonalgombák növekedését. Gombaellenes hatással rendelkező koncentrációban a növényi- és az emlőssejtekre nem fejtenek ki mérgező hatást, a szervezetbe bekerülve nem váltanak ki gyulladást. Extrém környezeti körülmények között is stabilak. Képesek más gombaellenes fehérjékkel és antimikotikumokkal kölcsönhatásba lépve azok hatékonyságát megnövelni. Ilyen defenzinszerű fehérjét eddig hat, az *Aspergillus*, a *Penicillium* és a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fonalgombából mutattak ki. A rendszertanilag távol álló gombafajok által termelt, szerkezetileg hasonló defenzinszerű proteinek hatásmódja és antimikrobiális spektruma jelentősen eltér egymástól, így külön-külön is értékes alapot szolgáltathatnak további vizsgálatokat (pl. szerkezet-antimikrobiális hatás összefüggésének vizsgálata) követően új, fehérjén alapuló gombaellenes stratégiák kifejlesztésére a gyógyászatban, a növényvédelemben, az

élelmiszer tartósításban, illetve a kulturális örökségeink (pl. festmények, freskók, épületek) penészkártevői elleni védekezésben.

Munkánk során egy új, a *Neosartorya fischeri* NRRL 181 izolátum által termelt, antifungális aktivitással rendelkező defenzinszerű fehérjét azonosítottunk és jellemeztünk, továbbá vizsgáltuk a fehérje antifungális tulajdonságait, hatásmódját és biológiai szerepét.

Eredményeink jelentős mértékben bővítik a defenzinszerű antifungális fehérjékkel kapcsolatos ismereteinket, új távlatokat nyitva meg lehetséges alkalmazásuk előtt.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A *Neosartorya fischeri* általános jellemzése

A *N. fischeri* az *Ascomycota* törzs *Eurotiales* rendjének *Fumigati* szekciójába tartozó teleomorf fonalgomba (anamorfja: *Aspergillus fischerianus*) (Raper és Fennell, 1965; Gams, 1985; Samson és mtsai., 2007). Elsősorban szaprofita, talajban, valamint bomló növényi mardványokon fordul elő; de jelentős élelmiszeripari károk okozójaként is leírták. Evolúciósan közeli rokona az *Aspergillus fumigatus*, a leggyakoribb humán kórokozó fonalgomba, mellyel ellentétben a *N. fischeri* csak opportunista humánpatogénként ismert és legyengült immunrendszerű betegekben okozhat keratitiszt, illetve tüdőaszpergillózist (Girardin és mtsai., 1995; Lonial és mtsai., 1997; Gori és mtsai., 1998). Optimális növekedési hőmérséklet-tartománya 26-45 °C. Szaporodási típusa hőmérsékletfüggő: 24 °C-on a teleomorf, 37 °C-on az anamorf alak dominál (Beuchat, 1986; Nielsen és mtsai., 1989). Szexuális szaporodása homotallikus, melynek eredményeként képződő askospórák különösen hőstabilak, néhány perces, 100 °C-os hőkezelés után is életképesek maradhatnak (Kavanagh és mtsai., 1963). A *N. fischeri* számos másodlagos metabolitot, mint például fomitremorgin-típusú alkaloid és indolszármazékokat, valamint fiscalinokat termel, melyek hatékonyan gátolják a fájdalomérzékelésben szerepet játszó P anyag (*substance P*) humán neurokinin receptorhoz való kötődését (Nielsen és mtsai., 1988; Wong és mtsai., 1993; Wakana és mtsai., 2006; Samson és mtsai., 2007).

3.2. Az antimikrobiális peptidek

Az antimikrobiális peptidek (AMP) az élővilágban széles körben, a prokariótáktól a gerincesekig előfordulnak. Az AMP-k olyan kis molekulatömegű, extracelluláris fehérjék, amelyek vírusok, baktériumok, gombák szaporodását és növekedését gátolják. A termelő szervezet védelméhez járulnak hozzá: mikroorganizmusok esetén az élőhely és a táplálék szempontjából kompetítor mikrobák, a magasabbrendű élőlényeknél az immunrendszer által károsnak ítélt mikroorganizmusok elpusztításával (Lehrer és Ganz, 1999; Marx 2004). Szerkezetüket tekintve α -helikális-szerkezetű, β -lemez-szerkezetű, illetve ezeket a szerkezeti elemeket vegyesen tartalmazó AMP-ket különböztetünk meg. Antimikrobiális spektrumuk és hatásmechanizmusuk eltérő lehet. Az AMP-k konstitutívan vagy valamilyen külső környezeti hatásra expresszálódnak. Magasabbrendűekben az AMP-k termelődését a

külső környezetből származó mikrobák, illetve azok anyagcseretermékei (pl. lipopoliszacharidok; vagy a gazda sejtkomponensei, mint például a butirát, a citokinek vagy a vitaminok) egyaránt indukálhatják (Hegedűs és Marx, 2013). Az utóbbi időben egyre több publikáció jelenik meg a szakirodalomban az AMP-k antimikrobiális hatásán túli egyéb, más jellegű biológiai funkcióiról, amelyek feltételezések szerint az AMP-k szignalizációs útvonalakban is betöltött szerepének tulajdoníthatók. Így pl. szerepük lehet a termelő szervezet differenciálódásában, növekedésében és egyedfejlődésben is (Hegedűs és Marx, 2013).

Az AMP-k legnagyobb csoportja a defenzinek családja, amit evolúciós szempontból rokon, nagy ciszteintartalmú, kis molekulatömegű, kationos, bázikus karakterű peptidek alkotnak. Ezeknek a széles spektrumú, amfipatikus fehérjéknek a szerkezetét intramolekuláris diszulfid-hidak stabilizálják. A másodlagos szerkezeti elemek alapján α -, β - és θ -defenzineket különböztetünk meg (Ganz, 2003; Hegedűs és Marx, 2013). A defenzineket, mint a veleszületett immunitás másodlagos védelmi rendszerének tagjait az 1980-as évek elején fedezték fel magasabbrendű élőlényekben. Humán defenzinokkal homológ fehérjék növényekben és rovarokban is megtalálhatók, illetve szerkezetileg nagyon hasonló proteinek jelenlétét gombákból is kimutatták. Antimikrobiális aktivitásukat jellemzően a sejtfalon, a sejtmembránon és a sejtszervecskéken fejtik ki (Yeaman és Yount, 2003; Theis és Stahl, 2004). Pozitívan töltött felületi régióiknak köszönhetően a sejtmembrán negatívan töltött komponenseihez kötődve megszüntetik a membrán integritását, ami plazmakiáramlást és sejthalált eredményezhet. Más esetben a membrán specifikus lipid- és/vagy fehérjekomponenséhez kapcsolódva szelektív módon ioncsatornákat aktiválhatnak vagy gátolhatnak, pórusképzést és/vagy (aktív) intracelluláris fehérjetranszportot idézhetnek elő. Kimutatták, hogy sejten belüli struktúrákhoz is kötődhetnek (Thevissen és mtsai., 2003; Brogden, 2005; Marx és mtsai., 2008), ami a reaktív oxigénfajták (*reactive oxygen species*, ROS) szintjének megemelkedését válthatja ki és programozott sejthalált indukálhat (*programmed cell death*, PCD) (Leiter és mtsai., 2005; Aerts és mtsai., 2009, 2011).

3.2.1. Ascomycota gombák defenzinszerű fehérjéi

Az 1990-es évek második felétől számos, a defenzinek szerkezetéhez nagyon hasonló proteint izoláltak és jellemeztek a tömlősgombák törzsébe tartozó fonalasgombákból. Közös tulajdonságuk az extracelluláris termelés, a kis

molekulatömeg, a bázikus jelleg, 6-8 cisztein molekula jelenléte és ebből következően több intramolekuláris diszulfid-híd kialakulása. A proteinek harmadlagos szerkezete hasonlóságot mutat a β -defenzinekéhez: 5-6 antiparallel állású β -lemez három hurokrégióval összekapcsolva (β -hordó). Kompakt struktúrájuk és a diszulfid-hidak jelenléte következtében a molekulák extrém környezeti hatásokkal és fehérjebontó enzimekkel szemben ellenállóak. Annak ellenére, hogy a fehérjék aminosavsorrendje nagyon eltérő, konzervált homológ régiók minden esetben megfigyelhetők. Ezek alapján két nagy csoportot különíthetünk el: (1) proteinek, amik tartalmazzák a *Penicillium chrysogenum* antifungális proteinre (PAF) jellemző klasztert; és (2) proteinek, amelyekre a *Penicillium brevicompactum* "bubble protein" (BP) klaszter a jellemző.

PAF klaszterrel rendelkező fehérjét eddig hat különböző fajba tartozó tömlősgombából izoláltak: *Aspergillus giganteus* (AFP); *Aspergillus niger* (ANAFP); *Aspergillus clavatus* (AcAMP, ACLA); *Fusarium polyphialidicum* (FPAP); *P. chrysogenum* (PAF, PgAFP) és *Penicillium nalgiovense* (NAF). A *Botryotinia fuckeliana*, a *Gibberella zeae*, a *N. fischeri*, számos *Fusarium* faj és a *Pyrenophora tritici-repentis* esetében egy-egy ortológ gén jelenlétére következtetnek genomai adatbázisok számítógépes elemzése alapján (1. Táblázat). A BP klasztert tartalmazó fehérjék csoportja mindez idáig egyetlen jellemzett képviselővel rendelkezik (*P. brevicompactum* Dierckx BP, AEQ36754), ugyanakkor *in silico* genomikus vizsgálatok alapján számos homológ jelenlétét feltételezik *A. fumigatus* Af29 (AFBP, XP_731495), *N. fischeri* NRRL 181 (NFBP, XP_003666363), *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (PCBP, XP_002568323), *Chaetomium globosum* CBS 148.51 (CGBP, XP_00122783) és *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 (MTBP, XP_003666363) izolátumokban (Seibold és mtsai., 2011; Galgóczy és mtsai., nem közölt adatok). Mindkét csoport hatékonyan gátolja számos más gomba növekedését. A proteinek, amelyekre a PAF klaszter a jellemző elsősorban a fonalgombák ellen hatásosak, míg a BP klasztert hordozók az élesztőfajok növekedését gátolják (Seibold és mtsai., 2011).

3.2.1.1. PAF-klasztert hordozó defenzinszerű proteinek

Az PAF-klaszterrel rendelkező defenzinszerű fehérjék feltételezhetően szerepet játszanak a tápanyagokért és az élőhelyért folytatott versenyben olyan gombafajokkal szemben, melyek hasonló ökológiai niche-t foglalnak el. Szerepet játszhatnak a termelő mikroorganizmus aszexuális differenciálódásában és konídiumképzésében

stresszkörülmények között. Ezek a tulajdonságok előnyhöz juttathatják a gombát a lehetséges konkurens mikroorganizmusokkal szemben. Mindezt alátámasztja az a megfigyelés is, hogy a defenzinszerű antifungális proteinek kódoló gének transzkripciója fokozódhat egy kompetítor mikroorganizmus jelenlétében (Meyer és Stahl, 2003; Marx, 2004).

Mindezek felvetik annak a lehetőségét, hogy a tömlősgombák törzsébe tartozó fonalassgombák egy defenzinszerű molekulákon alapuló védekezőrendszerrel rendelkeznek a konkurens gombafajokkal szemben.

Az eddigi vizsgálatok alapján a fonalassgombák által termelt defenzinszerű antifungális proteinek nagyfokú stabilitásuk, gazdaságos termeltethetőségük, és korlátozott toxicitásuk révén ígéretes jelöltnek bizonyulhatnak mezőgazdasági és gyógyászati célú felhasználás szempontjából (Marx, 2004; Meyer, 2008).

3.2.1.1.1. Fehérjeszerkezet

Az eddig izolált és feltételezett PAF-klasztert tartalmazó defenzinszerű fehérjéket az **1. Ábra**, és az **1. Táblázat** foglalja össze. Aminosavsorrendjük 14,5-98,9% azonosságot mutat, kivéve a korábban már említett NAF-ot és PAF-ot, amelyek 100%-ban megegyeznek. Az érett és már izolált ACLA, AcAMP, AFP, AFPNN₅₃₅₃, ANAFP, FPAP, PAF, NAF és PgAFP szekvenciája egymással 25,4-96,0%-ban azonos (**1. Ábra**). Három esetben írtak le ugyanazon faj eltérő izolátumaiból olyan PAF-klasztert hordozó defenzinszerű proteinek, melyek nagyfokú homológiát mutatnak, és az érett fehérjék szekvenciáiban néhány aminosavbeli eltérést mutatkozik. Az AFP_{NN5353} (*A. giganteus* A3274) 5 aminosavban különbözik az AFP-től (*A. giganteus* MDH 18894), az *A. niger* CBS 518.88 törzsből származtatható hipotetikus antifungális fehérje az ANAFP-hez (*A. niger* KTC 2025) viszonyítva 7 aminosav eltérést, míg az *A. clavatus* ES1 által termelt AcAMP mindösszesen 2 aminosav különbséget mutat az ACLA-hoz (*A. clavatus* VR1) viszonyítva (**1. Ábra**, Meyer, 2008; Skouri-Gargouri és Gargouri, 2008; Hajji és mtsai., 2010; Binder és mtsai., 2011).

Annak ellenére, hogy a proteinek aminosavsorrendje nagyon különböző, konzervált homológ régiók megfigyelhetők. Ilyenek a ciszteinek és az azokat határoló aminosavak (**1. Ábra**). Az érett fehérjék 51-58 aminosavból épülnek fel, molekulatömegük 5,8-6,6 kDa. További közös jellemzőjük a nagyszámú arginin és lizin következtében kialakuló bázikus karakter (Marx, 2004); a ciszteinek, illetve az általuk képzett 3-4 diszulfid híd jelenléte. Ez

utóbbiak a fehérjék kompakt szerkezetét stabilizálják tág pH- és hőmérsékleti tartományban, illetve a proteázok hatásával szemben (Lacadena és mtsai., 1995; Theis és mtsai., 2005; Batta és mtsai., 2009).

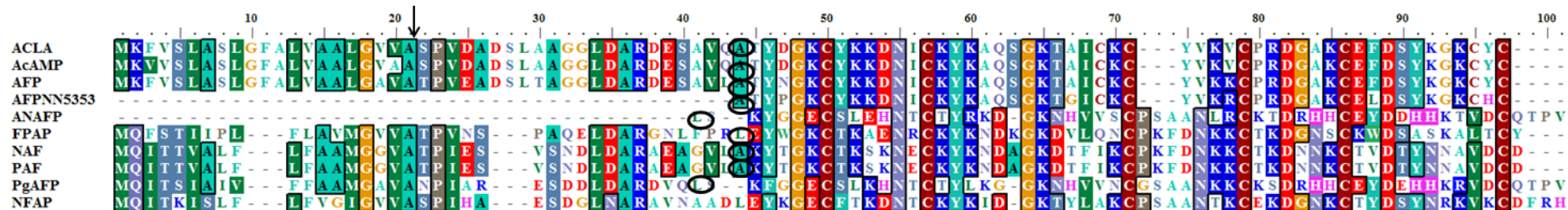
A fehérjék harmadlagos szerkezete nagymértékű hasonlóságot mutat (**2. Ábra**). Kísérletesen mindeztáig csak az AFP és a PAF harmadlagos szerkezetét határozták meg krisztallográfiás vagy egyéb spektroszkópiás eljárással (Meyer, 2008; Batta és mtsai., 2009; Skouri-Gargouri és mtsai., 2009; Rodríguez-Martín és mtsai., 2010). Mindkét antifungális fehérje öt β -redőjét három rövid hurok köti össze, melyek két, egymással szemben elhelyezkedő, merőleges szöget bezáró β -lemezzé rendeződő, ortogonális β -hordó stuktúrát hoznak létre (Batta és mtsai., 2009). Mindkét fehérje egy központi hidrofób aminosavakból felépülő magot tartalmaz. Az AFP központi hidrofób magját hidrofób, aromás és poláros oldalláncok veszik körül, melyek felszíni elhelyezkedésük miatt a fehérje nagymértékű oldhatóságát eredményezik különböző oldószerekben (Campos-Olivas és mtsai., 1995). Az AFP harmadlagos szerkezetét az érett fehérjékben a 7., 14., 26., 28., 33., 40., 49. és 51. pozíciókban elhelyezkedő ciszteinek által képzett négy diszulfid híd stabilizálja. Az AFP amfipatikus szerkezetét egy lizinekből képzett (K9, K10, K32) kationos, továbbá egy, tirozinból és három valinból álló (Y29, V30, Y45, V50) hidrofób domén alakítja ki (Meyer, 2008). A PAF esetén az érett fehérje 7., 14., 28., 36., 43. és 54. pozícióiban hat cisztein található. Az általuk képzett három diszulfid-hidat az egymásra merőleges β -lemezek veszik körül, ezáltal egy rejtett központi magot alakítanak ki. A PAF szintén amfipatikus felszínnel rendelkezik, melyet váltakozóan elhelyezkedő pozitív és negatív töltöttségű „foltok” hoznak létre. Helyspecifikus mutagenézissel bizonyították, hogy a nagyon konzervált és pozitív töltésű lizingazdag felszíni régiók kulcsszerepet játszanak a PAF célorganizmusra kifejtett toxikus hatásában (Batta és mtsai., 2009). Az AFP egy oligonukleotid/oligoszacharid kötő (OB) domént tartalmaz, ami képes megkötni az RNS-t, az egyszálú DNS-t, az oligoszacharidokat és a különböző fehérjéket (Meyer, 2008). *In vitro* kísérletekben bizonyították, hogy az AFP az OB motívumán keresztül a DNS-hez kötődve kromatinkondenzációt okoz. Az AFP képes továbbá az N-terminális kitinkötő doménjén keresztül a gombasejtfal felépítésében szerepet játszó kitinhez kapcsolódni (Martínez del Pozo és mtsai., 2002; Meyer, 2008). Ilyen hatást és hasonló doméneket a PAF esetében nem mutattak ki (Martínez del Pozo és mtsai., 2002).

1. Táblázat. Fonalasgombákból eddig azonosított és feltételezett PAF-klaszert hordozó defenzinszerű érett fehérjék fizikai és kémiai tulajdonságai és elsődleges fehérjeszerkezete.

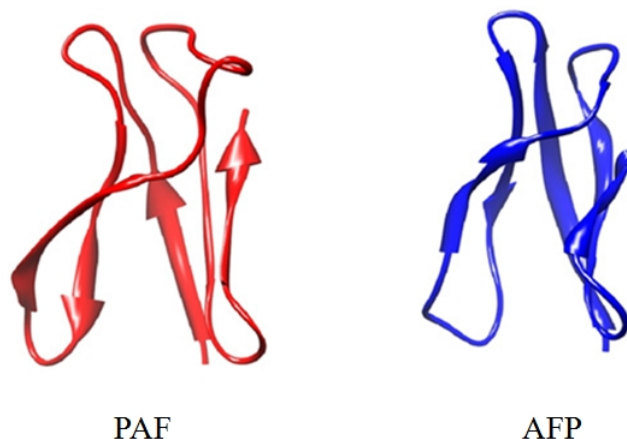
Protein	Gomba	Aminosavak száma	Molekula-tömeg (kDa)	Ciszteinek száma	Lys/Arg arány	pI	Azonosító szám	Izolált
ACLA	<i>Aspergillus clavatus</i> VR1	51	5.8	8	11/1	9.06	ABR 10398	+
AcAMP	<i>Aspergillus clavatus</i> ES1						ADC55278	+
	ATYDGGKCYKKDNICKYKAQSGKTAICKCYVKVCPRDGAKCEFD SYKGKCYC (Skouri-Gargouri és Gargouri, 2008; Hajji és mtsai., 2010)							
AFP	<i>Aspergillus giganteus</i> MDH 18894	51	5.8	8	12/1	9.27	X60771	+
	ATYNGKCYKKDNICKYKAQSGKTAICKCYVKVCPRDGAKCEFD SYKGKCYC (Wnendt és mtsai., 1994)							
AFP_{NN5353}	<i>Aspergillus giganteus</i> A3274	51	5.7	8	11/2	9.30	n.a.	+
	ATYPGKCYKKDNICKYKAQSGKTGICKCYVKRCPRDGAKCELD SYKGKCHC (Binder és mtsai., 2011)							
ANAFP	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 2025	58	6.6	6	5/3	7.14	n.a.	+
	LSKYGGEC SLEHNTCTYRKDGKNHV VSCPSAANLRCKTDRHHCEYDDHHKTVDCQTPV (Lee és mtsai., 1999)							
ANAFP2	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	58	6.6	6	2/5		XP_001391221	-
	LSKYGGEC SVEHNTCTYLKGGKDHIVSCPSAANLRCKTERHHCEYDEHHKTVDCQTPV (Meyer, 2008)							
FPAP	<i>Fusarium polyphialidicum</i> SZMC 11042	55	6.4	6	12/1	9.10	CAR 79015	+
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGKDV LQNCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSASKALTCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
NAF	<i>Penicillium nalgiovense</i> BFE 66, 67, 474	55	6.3	6	13/0	8.93	n.a.	+
	AKYTGKCTKSKNECKYKNDAGKDTFIKCPKFDNKKCTKDNNKCTVDTYNNAVD CD (Geisen, 2000)							
NFAP	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	57	6.6	6	11/2	8.93	CAQ42994	+
	LEYKGECFTKDNTCKYKIDGKTYLAKCPSAANTKCEKDG NKCTYDSYNRKVKCDFRH (jelen PhD értekezés)							
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176	55	6.3	6	13/0	8.93	AAA 92718	+
	AKYTGKCTKSKNECKYKNDAGKDTFIKCPKFDNKKCTKDNNKCTVDTYNNAVD CD (Marx és mtsai., 1995)							
PgAFP	<i>Penicillium chrysogenum</i> RP42C	58	6.5	6	8/2	8.83	ACX54052	+
	LSKFGGEC SLKHNTCTYLKGGKHNHV VNCGSAANKKCKSDRHHCEYDEHHKRVDCQTPV (Rodríguez-Martín és mtsai., 2010)							
PTRAFF	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	56	6.2	6	8/3	9.02	XP_001934325	-
	IKFDGKCTKSTDQCSFTRNGKTSISKSTATAVNYRCTKDKNPCTYDDVDGKTRCT (Galgóczy és mtsai., 2013)							

GZAFP	<i>Gibberella zeae</i> NRRL 31084	55	6.4	6	12/1	9.10	XP_384921	-
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGKDVLPQCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSASKALTCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
FBAP	<i>Fusarium boothi</i> SZMC 3855, 3856	55	6.4	6	12/1	9.10	CAR79009-79010	-
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGKDVLPQCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSASKALTCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
FPOAP	<i>Fusarium poae</i> SZMC 11045	55	6.4	6	12/1	9.10	CAR79017	-
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGKDVLPQCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSASKALPCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
FGRAP	<i>Fusarium graminearum</i> SZMC 3887, 3888	55	6.4	6	12/1	9.10	CAR79011-17902	-
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGKDVLPQCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSASKALTCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
FPSAP	<i>Fusarium pseudograminearum</i> NRRL 28069	55	6.4	6	12/1	9.10	CAR79013	-
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGKDVLPQCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSASKALTCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
FCEAP	<i>Fusarium cerealis</i> SZMC 11048	55	6.4	6	12/1	9.10	CAR79014	-
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGKDVLPQCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSASKALTCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
FAVAP	<i>Fusarium avenaceum</i> SZMC 11044	55	6.4	6	11/2	9.12	CAR79018	-
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGRDVLQCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSATKALTCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
FCUAP	<i>Fusarium culmorum</i> SZMC 11039, 3890, 29354, 29388	55	6.4	6	11/2	9.12	CAR79019-79022	-
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGRDVLQCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSATKALTCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
FASAP	<i>Fusarium asiaticum</i> SZMC 3891	55	6.4	6	11/2	9.12	CAR79023	-
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGRDVLQCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSATKALTCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
FSPAP	<i>Fusarium sporotrichioides</i> SZMC 11043	55	6.4	6	12/1	9.10	CAR79016	-
	LEYWGKCTKAENRCKYKNDKGKDVLPQCPKFDNKKCTKDGNSCKWDSASKALTCY (Galgóczy és mtsai., 2013)							
BFAP	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	56	6.0	8	0/2	4.04	XP_001548954	-
	TTYRGTCQTGTQVCAYDVDETVGDSCNCDTSQLCQGDGNACFYNDTPGVRFHPCPS (Galgóczy és mtsai., 2013)							

n.a.: nincs adat



1. Ábra. Az izolált, tömlősgomba-eredetű, PAF-klaszert hordozó defenzinszerű fehérjék és a *Neosartorya fischeri* NRRL 181 által feltételezeten termelt defenzinszerű protein (NFAP, GeneBank ID: XP_001262586) aminosav-sorrendjének összehasonlítása. A feltételezett szignálszekvencia lehasadási helyét nyíllal, az érett fehérjék első aminosavát aláhúzással jelöltük. ACLA: *Aspergillus clavatus* VR1, AcAMP: *Aspergillus clavatus* ES1, AFP: *Aspergillus giganteus* MDH 18894, AFPNN₅₃₅₃: *A. giganteus* A3274, ANAFP: *Aspergillus niger* KCTC 2025, FPAP: *Fusarium polyphialidicum* SZMC 11042, NAF: *Penicillium nalgiovense* BFE 66, 67, 474, PAF: *Penicillium chrysogenum* Q176, PgAFP: *P. chrysogenum* RP42C.



2. Ábra. A *Penicillium chrysogenum* antifungális protein (PAF) és *Aspergillus giganteus* antifungális protein (AFP) harmadlagos szerkezete (Seibold és mtsai., 2011).

3.2.1.1.2. Transzkripció szabályozás és expresszió

Az AFP és a PAF preproteinként szintetizálódik, amely *in silico* vizsgálatok alapján az ACLA és PgAFP esetében is bizonyított (Marx, 2004; Skouri-Gargouri és mtsai., 2009; Rodríguez-Martín és mtsai., 2010). A preproteinekről a fehérje érési és sejtből való kijutási folyamata során egy szekréciós- és egy pro-szekvencia hasad le (**1. Ábra**). Martínez-Ruiz és munkatársai (1997) leírták az érett AFP hosszabb változatát (Lf-AFP) is, ami az N-terminális részen további hat aminosavat tartalmaz. Ez a fehérje az *A. giganteus* fermentlevében a tenyésztés korai szakaszában átmenetileg mutatható ki. Ez alapján feltételezhető, hogy az AFP érése egy további hasítási lépést tartalmaz, melyet egy eddig még nem azonosított extracelluláris proteáz végez. Az Lf-AFP antifungális hatása jelentős mértékben gyengébb az AFP hatásához viszonyítva, ami arra utal, hogy az Lf-AFP az érett fehérje prekursora (Martínez-Ruiz és mtsai., 1997).

Az AFP és PAF fehérjehozamának maximumát a stacionárius növekedési fázisban, 70-90 órás folyadéktenyésztésben mérték, amit különböző környezeti faktorok és vegyületek befolyásolnak (Marx és mtsai., 1995; Meyer és mtsai., 2002a; Marx, 2004). Az előzőekhez hasonlóan az ACLA extracelluláris koncentrációjának a maximumát szintén 96 órás folyadéktenyésztés esetében mérték (Skouri-Gargouri és mtsai., 2009). Szilárd táptalajon történő növesztés során ritmikus *afp*-expressziót figyeltek meg. A felületi tenyésztésben az *afp* és *paf* expressziós mintázatára egyaránt jellemző, hogy az aszexuális fejlődés során, meghatározott fejlődési stádiumokhoz kötve szigorú térbeli és időbeli szabályozás alatt áll (Meyer és mtsai., 2002a; Hegedűs és mtsai., 2011a). Mindkét gén a

növekedési stádiumban expresszáldódik, kizárólag a vegetatív micéliumban; sem a konídiofórokban, sem a konídiospórákban nem fejeződnek ki (Meyer és mtsai., 2002a; Meyer, 2008; Hegedűs és mtsai., 2011a).

Az AFP termelődésében a szén katabolit represszióinak és a nitrogén metabolit represszióinak nincs meghatározó szerepe. Ezzel szemben különböző stresszfaktorok (lúgos pH, só, alkohol, hő, szén- és foszfátéhezés), továbbá más gombával történő együtt tenyésztés fokozza az *afp* gén transzkripcióját, míg savas pH és feleslegben adott foszfát jelenléte gátolja azt (Meyer és mtsai., 2002a,b; Marx, 2004; Meyer, 2008). A *paf* gén expressziója szénéhezés és limitált glükóz koncentráció hatására, illetve másodlagos szénforrások jelenlétében indukálódik. Az AFP-vel ellentétben a hőszokk és a foszfát-koncentráció nincs hatással a PAF termelődésére. A *paf* mRNS szintézisét a glutamát gátolja, ezzel szemben a NaNO_3 indukálja. A pH-függő génregulációt a *paf* esetében még nem vizsgálták (Marx és mtsai., 1995; Marx, 2004).

A fent említett megfigyelések alapján, az *afp* és *paf* 5' upstream régiói külső környezeti szignálokra és stresszhatásra termelődő, a gén transzkripcióját szabályozó elemek kötőhelyeit tartalmazzák (Marx, 2004; Meyer, 2008). Feltételezések szerint az *afp* transzkripciójában a kalcineurin jelátviteli útvonal, a foszfátéhezés és az aszexuális fejlődést szabályozó mechanizmusok játszanak központi szerepet. Az *afp* promóter-régiójában öt lehetséges Crz1p (stressz válaszelem) kötőhelyet azonosítottak. A Crz1p-t környezeti stresszhatásokra (só, pH, hőszokk) a kalcineurin aktiválja. Hőszokk és alacsony foszfátszintek az *afp* transzkripcióját és az AFP szekrécióját fokozzák. Az *afp* expresszióját a PalcA transzkripciós faktoron (foszfátszabályozó elem) keresztül a foszfát csökkentheti, azonban a feltételezés kísérletes igazolása még várat magára. Kísérletes megfigyelések alapján a lúgos pH foszfátéhezést idéző gombákban, ami arra utal, hogy a gén pH- és foszfát-függő szabályozása feltételezhetően kapcsolatban áll. Annak ellenére, hogy két lehetséges pH-függő PacC transzkripciós faktor (pH-válaszelem) kötőhelye található meg a gén upstream régiójában, lúgos közegben az *afp* expressziójának fokozásában nincs jelentős szerepük, és erősen gátolják az expressziót savas pH-jú, illetve foszfátot feleslegben tartalmazó tápközeg esetében. Az RlmA transzkripciós faktor (sejtfal integritás elem) fokozza az AFP termelődését, amelynek mennyisége a sejtfalintegritás változása esetén megemelkedik. A CreA-közvetített szén katabolit represszióinak és az AreA-közvetített nitrogén metabolit represszióinak nincs szerepe az *afp* transzkripciójának szabályozásában. Az *afp* promóter régiójában azonosítottak egy StuA kötőhelyet, mely

fonalassgombákban az konidiogenezis és másodlagos anyagcsere központi szabályozó eleme. A StuA transzkripció szintje az aszexuális differenciálódásra képes vegetatív hifákban emelkedik meg. Előzetes vizsgálatok alapján az *afp* expresszióját a StuA pozitívan befolyásolja (Meyer, 2008).

A *paf* expresszióját szintén különböző transzkripció faktorok befolyásolhatják a promóter régió analízise alapján. A CreA (szén katabolit represszor elem) csökkentheti az expressziót glükóz jelenlétében, míg a két feltételezett AreA (nitrogén metabolit represszor elem) kötőhely nitrogén metabolit represszióra utal. Egy pH-függő mechanizmus és egy stressz-indukálta fehérje szabályozó szerepét is feltételezik a promóter régióban azonosított négy *pacC* (pH-szabályozó elem) és két *Stre* (stressz-szabályozó elem) konszenzus motívum alapján (Marx, 2004). A *paf* expressziójának szabályozásában feltételezhetően a *VelA* is részt vesz, ami a konidiogenezist és másodlagos metabolit-termelést szabályozó fehérje (Hegedűs és mtsai, 2011a).

Összefoglalva, a PAF és AFP expresszióját egymással bonyolult kapcsolatban álló, összetett szabályozó rendszerek befolyásolják (Marx, 2004; Meyer, 2008).

3.2.1.1.3. Antifungális spektrum és hatás

A fonalassgombák által termelt, PAF klaszterrel rendelkező defenzinszerű fehérjék antifungális spektruma eltérő, azonban az általuk létrehozott antifungális hatás nagyon hasonló (Marx, 2004). A fehérjékre érzékeny gombákban a hifanövekedés és a spóra csírázásának gátlása, a membránintegritás megszűnése, oxidatív stressz, a sejtfal rigiditásának megváltozása figyelhető meg és apoptózis alakul ki (Kaiserer és mtsai., 2003; Theis és mtsai., 2003,2005; Marx, 2004). A fehérje jelenlétében a hifák többszörösen elágazó, torzult növekedést mutatnak, a hifacsúcsok duzzadtakká válnak, és sejtmagok halmozódnak fel bennük (Marx, 2004). ACLA-val fungisztatikus koncentrációban kezelt *Fusarium oxysporum* micéliumokban a sejtfal kiépülés megváltozásának következtében a sejtek „protoplasztszerű” fenotípusát figyelték meg (Skouri-Gargouri és mtsai., 2009).

A PAF klaszterrel rendelkező defenzinszerű fehérjék antifungális aktivitása dózisfüggő: szubletális koncentrációban alkalmazva növekedést késleltető, míg nagyobb koncentrációban fungisztatikus hatás érhető el (Kaiserer és mtsai., 2003; Theis és mtsai., 2003; Marx, 2004; Skouri-Gargouri és mtsai., 2009). Antimikrobiális hatásukat az egy- illetve kétértékű kationok jelenléte jelentősen csökkenti. Ilyen hatást az AFP esetén 20

mM-nál magasabb KH_2PO_4 , 50 és 100 mM közötti KCl/NaCl , a PAF esetén 20 mM-nál magasabb MgCl_2 , 50 és 100 mM közötti Na_2SO_4 koncentrációnál írtak le, míg az ACLA aktivitása 50 mM NaCl és 10 mM kétértékű kationok jelenlétében (Mn^{2+} , Fe^{2+} és Ca^{2+}) csökkent jelentős mértékben (Marx, 2004; Meyer, 2008; Skouri-Gargouri és mtsai., 2009). Martín-Urdiroz és mtsai. (2009) eredményei alapján a kationok megakadályozzák az AFP kötődését a gomba felszínéhez. Az AFP ösztöztetése szintén pozitív, ezért a kationok gátlása feltételezhetően abban nyilvánul meg, hogy a gombák sejtfelszínén lévő negatív kötőhelyekről kompetítor módon kiszorítják a fehérjét (Martín-Urdiroz és mtsai., 2009). Hasonló gátló hatást figyeltek meg más növényi és állati antimikrobiális proteinek esetén (Marx, 2004).

A fonalgomba-eredetű defenzinszerű fehérjék antifungális spektruma eltér egymástól, az érzékeny fajok között csak kismértékű átfedés figyelhető meg (Marx, 2004). Antifungális aktivitásukat elsődlegesen más fonalgombákkal szemben fejtik ki (Marx, 2004; Meyer, 2008). Hatékonyan gátolják számos jelentős, opportunista humán és/vagy növénypatogén gomba növekedését (Lacadena és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 1999; Geisen, 2000; Meyer és mtsai., 2002a; Meyer és Stahl, 2003; Moreno és mtsai., 2003, 2006; Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2007, 2008; Barna és mtsai., 2008; Meyer, 2008). Az ANAFP, AFP, PAF és NAF tömlős- és járomspórás gombafajok növekedését, spóráinak csírázását gátolja ($\text{MIC}=1\text{-}200\text{ }\mu\text{g/ml}$) (Lacadena és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 1999; Kaiserer és mtsai., 2003; Moreno és mtsai., 2003, 2006; Theis és mtsai., 2003; Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2007, 2008; Barna és mtsai., 2008; Meyer, 2008). A PgAFP húsipari termékeken előforduló, mikotoxintermelő *Penicillium echinulatum*, *Penicillium commune* és *A. niger* ellen hatékony (Rodríguez-Martín és mtsai., 2010). Élesztőkkel szembeni antifungális aktivitással az ANAFP (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Trichosporon beigelii*; $\text{MIC}=8\text{-}15\text{ }\mu\text{M}$) és az FPAP rendelkezik (*Candida inconspicua*, *Candida lipolytica*, *Candida lusitanae*, *Candida norvegica*; $\text{MIC}=150\text{ }\mu\text{g/ml}$) (Lee és mtsai., 1999; Galgóczy és mtsai., 2013). Bazídiumos gombák érzékenységéről mindezidáig kevés információ áll rendelkezésre: A *Rhodotorula mucilaginosa* az AFP-vel szemben rezisztensnek, míg a *Trichosporon beigelii* és a *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* az ANAFP-pal és PAF-fal szemben érzékenynek bizonyult (Lacadena és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 1999; Barna és mtsai., 2008). Antibakteriális aktivitást eddigi eredmények alapján csak az ACLA mutat *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia*

coli ellen (Hajji és mtsai., 2010). Az eddig vizsgált érzékeny gombafajok listája a **2. Táblázat**ban található.

A PAF klaszterrel rendelkező defenzinszerű fehérjék antifungális hatása nagymértékben függ az alkalmazott tápközegtől. Egy korábbi tanulmányban a PAF a járomspórás gombák növekedését minimál táptalajon jobban gátolta, mint komplett táptalajon (Galgóczy és mtsai, 2005). Ez a gombák különböző tápanyagigényével éppúgy magyarázható, mint az alkalmazott tápközegkomponensek jelenlétével (pl. sók), melyek a PAF aktivitását negatívan befolyásolhatják (Kaiserer és mtsai., 2003; Marx, 2004). Hasonló jelenséget írtak le együtt-tenyésztései kísérletekben az AFP-t termelő *A. giganteus* izolátum esetében (Meyer és mtsai., 2003)

2. Táblázat. Az eddig izolált, fonalgombák által termelt PAF-klaszterrel rendelkező defenzinszerű proteinek antifungális spektruma.

Antifungális fehérje	Érzékeny gombafaj	Referencia
ACLA	<u>Ascomycota</u> <i>Alternaria solani</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i>	Skouri-Gargouri és Gargouri, 2008
AcAMP	<u>Ascomycota</u> <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i>	Hajji és mtsai., 2010
ANAFP	<u>Ascomycota</u> <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. flavus</i> ^O , <i>A. fumigatus</i> ^O); <i>Candida albicans</i> ^O ; <i>Fusarium</i> spp. (<i>F. oxysporum</i> ^{O, PN} , <i>F. solani</i> ^{O, PP}); <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <u>Basidiomycota</u> <i>Trichosporon beigelii</i> ^O	Lee és mtsai., 1999
AFP	<u>Ascomycota</u> <i>Alternaria alternata</i> ^{O, PN} ; <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. awamorii</i> , <i>A. flavus</i> ^O , <i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> ^O , <i>A. terreus</i> ^O); <i>Botrytis cinerea</i> ^{PN} , <i>Erysiphe graminis</i> ^{PN} , <i>Fusarium</i> spp. (<i>F. aquaeductum</i> ^{PN} , <i>F. bubigenum</i> ^{PN} , <i>F. culmorum</i> ^{PN} , <i>F. equiseti</i> ^{PN} , <i>F. lactis</i> ^{PN} , <i>F. lini</i> ^{PN} , <i>F. moniliforme</i> ^{O, PN} , <i>F. oxysporum</i> ^{O, PN} , <i>F. poae</i> ^{PN} , <i>F. proliferatum</i> ^{PN} , <i>F. sambucinum</i> ^{PN} , <i>F. solani</i> ^O , <i>F. sporotrichioides</i> ^{PN} , <i>F. vasinfectum</i> ^{PN}); <i>Gliocladium roseum</i> ; <i>Magnaporthe grisea</i> ^{PN} ; <i>Penicillium purporogenum</i> ; <i>Trichoderma</i> spp. (<i>T. harzianum</i> ^O , <i>T. koningii</i>) <u>Oomycota</u> <i>Phytophthora infestans</i> ^{PN}	Lacadena és mtsai., 1995; Moreno és mtsai., 2003, 2006; Theis és mtsai., 2003; Meyer, 2008
AFP _{NN5353}	<u>Ascomycota</u> <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. flavus</i> ^O , <i>A. fumigatus</i> ^O , <i>A. giganteus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> ^O , <i>A. terreus</i> ^O); <i>Botrytis cinerea</i> ^{PN} ; <i>Fusarium</i> spp. (<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>oxysporum</i> ^{O, PN} , <i>F. sambucinum</i> ^{PN}); <i>Gliocladium roseum</i> ; <i>Neurospora crassa</i> ; <i>Penicillium chrysogenum</i> ; <i>Trichoderma koningii</i>	Binder és mtsai., 2011
FPAP	<u>Zygomycota</u> <i>Gilbertella persicaria</i> <u>Ascomycota</u> <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> ^O); <i>Candida</i> spp. (<i>C. inconspicua</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. norvegica</i>) <i>Cladosporium herbarum</i> ^{PN} ; <i>Trichoderma harzianum</i> ^O	Galgóczy és mtsai., 2013
NAF	<u>Zygomycota</u> <i>Mucor</i> sp. <u>Ascomycota</u> <i>Aspergillus flavus</i> ^O ; <i>Byssoschlamys</i> sp., <i>Fusarium solani</i> ^{O, PN} , <i>Geotrichum candidum</i> ^O ; <i>Penicillium</i> spp. (<i>P. digitatum</i> , <i>P. italicum</i> , <i>P. roquefortii</i>)	Geisen, 2000
PAF	<u>Zygomycota</u> <i>Absidia corymbifera</i> ^O ; <i>Micromucor ramanniana</i> ; <i>Mortierella elongata</i> ^O ; <i>M. nantahalensis</i> ^O ; <i>M. wolffii</i> ^O ; <i>Mucor piriformis</i> ^O ; <i>Mycotypha africana</i> ; <i>Rhizomucor miehei</i> ^O ; <i>R. pusillus</i> ^O ; <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> ^O ; <i>R. oryzae</i> ^O ; <i>Thamnostylum piriforme</i> ; <i>Umbelopsis isabellina</i> ; <i>Zygorhynchus macrocarpus</i> <u>Ascomycota</u> <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. flavus</i> ^O , <i>A. fumigatus</i> ^O , <i>A. giganteus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> ^O , <i>A. terreus</i> ^O); <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> ^{PN} ; <i>Botrytis cinerea</i> ^{PN} ; <i>Cladosporium herbarum</i> ^{PN} ; <i>Cochliobolus carbonum</i> ^{PN} ; <i>Fusarium oxysporum</i> ^{O, PN} ; <i>Gliocladium roseum</i> ^{PN} ; <i>Hypocrea orientalis</i> ^O ; <i>Neurospora crassa</i> , <i>Trichoderma</i> spp. (<i>Trichoderma atroviride</i> ^{*O} , <i>T. citrinoviride</i> ^{*O} , <i>T. harzianum</i> ^{*O} , <i>T. inhamatum</i> ^{*O} , <i>T. koningii</i> , <i>T. longibrachiatum</i> ^{*O}); <i>Trichophyton</i> spp. (<i>T. mentagrophytes</i> ^{PH} , <i>T. rubrum</i> ^{PH} , <i>T. tonsurans</i> ^{PH}); <i>Microsporum</i> spp. (<i>M. canis</i> ^{PH} , <i>M. gypseum</i> ^{PH}); <u>Basidiomycota</u> <i>Puccinia recondita</i> f. sp. <i>tritici</i> ^{PN}	Kaiserer és mtsai., 2003; Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2007, 2008; Barna és mtsai., 2008
PgAFP	<u>Ascomycota</u> <i>Penicillium</i> spp. (<i>P. echinulatum</i> , <i>P. commune</i>), <i>Aspergillus niger</i>	Rodríguez-Martín és mtsai., 2010

*: nem közölt adat, Galgóczy és mtsai., ^O: opportunista humánpatogén gombafaj, ^{PH}:

potenciálisan humánpatogén gombafaj, ^{PN}: potenciálisan növénypatogén gombafaj

3.2.1.1.4. Hatásmód

Az aminosavsorrendbeli különbségek ellenére a fonalagombák által termelt, PAF-klasztert hordozó defenzinszerű antifungális proteinek fizikai-kémiai tulajdonságai, harmadlagos szerkezete és a kiváltott antifungális hatás nagyon hasonlóak. A különböző fehérjék toxikus hatása, habár néhány közös jellemzővel rendelkezik, eltérő módon valósul meg. Az AFP és a PAF – közvetlenül vagy közvetetten kapcsolatba lépve a sejtfalbioszintézissel – a hifa polarizált növekedését zavarja meg (Theis és mtsai., 2003; Meyer, 2007; Binder és mtsai., 2010a). Toxicitásuk további közös vonása, hogy jelenlétükben a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisa felborul, ami progamozott sejthalálhoz vezethet.

Az AFP antifungális hatása több szinten érvényesül. Az érzékeny gombafajokban az AFP nagy mennyiségben a sejtfal külső rétegében és a sejtfalban halmozódik fel, ami a sejtfal integritásának a megszűnését okozza (Theis és mtsai., 2005). Az AFP kisebb hányada elektrosztatikusan köt a sejtmembránhoz és membránpermeabilizációt, pórusképzést vált ki (Theis és mtsai., 2003). Az AFP-rezisztens gombafajok esetén a fehérje a sejten belül akkumulálódik, majd lebontásra kerül (Theis és mtsai., 2003, 2005). *In vitro* kísérleti körülmények között bizonyították, hogy az AFP az N-terminális kitin-kötő motívumán keresztül a kitinhez kapcsolódik és a sejtfal kiépülését akadályozza meg. Az AFP specifikusan a III. és V. típusú kitin-szintázokat gátolja, amit az *Aspergillus oryzae* és a *F. oxysporum* esetében bizonyítottak is (Hagen és mtsai., 2007). Ezek az enzimek kizárólagosan a gombákra jellemzőek és nélkülözhetetlenek a polarizált hifanövekedés fenntartásához, valamint a patogén gombák virulenciájához (Meyer, 2008). A kitinszintézisben szerepet játszó CHS7 chaperon-szerű fehérje, a sejtfal glukán-bioszintézisében résztvevő GAS1 glukanozil-transzferáz, valamint a sejtfal pH-függő szabályozását biztosító PacC transzkripciós faktor szerepet játszanak az AFP antifungális hatásának a kialakulásában. Az AFP a sejtfal szerkezetét ezeken a faktorokon keresztül módosíthatja, ugyanis a $\Delta pacC$, a $\Delta chs7$ és a $\Delta gas1$ *F. oxysporum* törzsek az AFP-vel szemben ellenállóknak bizonyultak a kontroll törzshöz képest (Martín-Urdiroz és mtsai., 2009). A kitinszintézis hifacsúcsi gátlása következtében a sejtfal integritása megszűnik, amire kompenzációs válaszként a PkcA/MpkA szignalizáción keresztül a sejtfalintegritási útvonal (CWIP, *cell wall integrity pathway*) RhoA-független módon indukálódik az AFP-érzékeny *Aspergillus* fajokban (Hagen és mtsai., 2007; Binder és mtsai., 2011). Az így aktivált RhoA-független CWIP fokozza az α -1,3-glukán szintáz gén (*agsA*) expresszióját, ami a sejtfal újraépítést indukálja. Azonban megfigyelték, hogy ez a hatás önmagában nem

elegendő az AFP toxicitásának ellensúlyozásához. Feltételezések szerint az AFP_{NN5353} antifungális hatása elsősorban a RhoA-GTPáz aktiváló proteinkomplexnek (GAP) a gátlásán keresztül valósul meg (Binder és mtsai., 2011).

Az AFP_{NN5353} az érzékeny sejtekben a citoszól nyugalmi Ca^{2+} -koncentrációjának hirtelen és jelentős mértékű növekedését eredményezi (Binder és mtsai., 2011). A Ca^{2+} -homeosztázis tartós megváltozása programozott sejthalálhoz (PCD, *programmed cell death*) vezethet (Leiter és mtsai., 2005). Az emelkedett extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció jelenléte az AFP_{NN5353} toxicitását több szinten ellensúlyozza, ugyanis önmagában vagy a Ca^{2+} -szignalizációs kaszkádon keresztül csökkenti a citoszól nyugalmi Ca^{2+} -szintjét. Az AFP_{NN5353} a Ca^{2+} -szignalizációs kaszkádon keresztül a sejtfal bioszintézisét indukálja a ChsD kitin-szintáz expressziójával (Binder és mtsai., 2011). A membránban található szfingolipidek a polarizált növekedés fenntartásához szintén szükségesek, amelyek előzetes vizsgálatok alapján másodlagos receptorai az AFP-nek (Li és mtsai., 2006; Meyer, 2008). Az AFP gombaellenes aktivitásához feltételezhetően hozzájárul az a tulajdonsága is, hogy oligonukleotid/oligoszacharid (OB)-kötő doménjével képes kölcsönhatásba lépni nukleinsavakkal és oligoszacharidokkal (Martínez del Pozo és mtsai., 2002).

A PAF az antifungális hatását szintén komplex módon fejti ki. PAF-kezelt *Aspergillus nidulans*-ban a sejten belül reaktív oxigénfajták (ROS) megjelenését, apoptotikus markereket és a membránnal határolt sejtorganellumok szétesését igazolták (Kaiserer és mtsai., 2003; Leiter és mtsai., 2005), továbbá a PAF csökkenti az *A. nidulans* hifák kitintartalmát és a hifacsúcsokban felhalmozódó aktin mennyiségét (Binder és mtsai., 2010a). A fehérje receptormediált endocitózissal jut be a sejtbe és ott a citoplazmában lokalizálódik (Kaiserer és mtsai., 2003; Leiter és mtsai., 2005; Marx és mtsai., 2008). Továbbá kimutatták, hogy a fehérje G-protein által közvetített jelátviteli úton programozott sejthalált eredményez, ám ennek a pontos mechanizmusa a mai napig még nem teljesen tisztázott. A PAF az *A. nidulans*-ban indukálja a G-protein jelátviteli út aktiválta ciklikus AMP/protein kináz A (cAMP/PkaA) szignalizációs kaszkádot. A cAMP/PkaA út indukciója az aktin abnormális polimerizációját, az apoláris növekedés hiányát és apoptózist eredményez (Binder és mtsai., 2010a; Hegedűs és mtsai., 2011b). További kísérletek igazolták, hogy a PAF a FadA-függő heterotrimer G-protein közvetítette jelátviteli úton szintén antifungális hatást fejt ki (Leiter és mtsai., 2005; Hegedűs és mtsai., 2011b). Ez az útvonal *A. nidulans*-ban a vegetatív növekedés fenntartását szabályozza. A

FadA-függő szignalizációs úton a PAF nagy valószínűséggel az intracelluláris glutation redox egyensúly felborulását idézi elő, amit a gombákban az apoptózis egyik kiváltó tényezőjeként tartanak számon. Az AFP-hez hasonlóan, a RhoA-GAP komplex gátlásával a PAF szintén előidézheti az aktinpolimerizáció és a polarizált növekedés zavarát (Binder és mtsai., 2010a). Az RgsA regulátor fehérje a GanB-függő heterotrimer G-protein szignalizációs úton keresztül képes gátolni az oxidatív stresszválaszt, ezáltal a reaktív oxigén fajták szintjének az emelkedését okozza, ami szintén apoptózist indukál. Az RgsA-nak a PAF toxicitásában betöltött szerepét igazolta az, hogy az *rgsA* deléciója PAF-toleráns fenotípust eredményez (Hegedűs és mtsai., 2011b). Az AFP-vel ellentétben a PAF nem indukálja a CWIP-t a G-protein közvetítette protein kináz c/mitogén-aktivált protein kináz (pkc/MpK) jelátviteli útvonalon keresztül. A PAF ennek a MpkA tagját gátolhatja (Binder és mtsai., 2010a).

A PAF az érzékeny organizmusban a plazmamembrán hiperpolarizációját váltja ki. Az *A. nidulans*-ban szelektív K^+ -ion kiáramlást okoz, továbbá, az AFP-hez hasonlóan, a *Neurospora crassa*-ban a citoplazma nyugalmi Ca^{2+} -szintjének gyors emelkedését okozza és megzavarja a Ca^{2+} -szignalizációt (Leiter és mtsai., 2005; Binder és mtsai., 2010b). A citoszól nyugalmi Ca^{2+} -szintjének gyors megváltozása oxidatív stresszt, majd apoptózist indukál (Marx, 2008). A tápközeghez adott Ca^{2+} -ionok a PAF antifungális hatását szintén csökkentik (Binder és mtsai., 2010b).

3.2.1.1.5. Biológiai szerep

A legtöbb fonalagomba védekezésül a környezetében jelen lévő, különböző mikrobák ellen antimikrobiális aktivitású proteinek szekretál a környezetébe (Peberdy, 1999). Ezeknek a proteineknek a szerkezete, hatásmódja, és antimikrobiális spektruma nagymértékben eltérő lehet (Epand, 1999; Selitrennikoff, 2001; Theis és Stahl, 2004).

A fonalagombák által termelt, defenzinszerű antimikrobiális fehérjék élettani szerepe a mai napig nem teljesen tisztázott. Vizsgálatok alapján szerepet játszhatnak az aszexuális differenciálódásban stressz körülmények hatására, illetve a tápanyagokért és az élőhelyért folytatott versenyben a hasonló ökológiai niche-t elfoglaló mikroorganizmusokkal szemben (Marx, 2004; Hegedűs és mtsai., 2011a). Ez utóbbi feltételezést alátámaszthatja az a megfigyelés miszerint egy AFP-termelő *A. giganteus*, és egy AFP-érzékeny *F. oxysporum* izolátum együtt-tenyésztésekor a fermentáléban

megemelkedett az AFP koncentrációja (Jacobs, 1995). Meyer és Stahl (2003) egy β -glükuronidáz alapú riporter rendszer alkalmazásával vizsgálta, hogy az *A. giganteus* képes-e egy AFP-érzékeny, kompetitor gomba jelenlétét érzékelni, ezáltal az *afp* transzkripcióját fokozni és így előnyhöz jutni a tápanyagokért folytatott versenyben. Kísérleteik alapján az AFP biológiai funkciója összetettnek bizonyult: számos fonalgombafaj mellett néhány baktérium (*P. aeruginosa*) és élesztőfaj (*S. cerevisiae*, *C. albicans*) esetében is növelte a β -glükuronidáz gén transzkripcióját. Ezek a mikroorganizmusok nem kompetitorai az *A. giganteus*-nak és az AFP sem gátolja növekedésüket (Lacadena és mtsai., 1995; Marx, 2004). Ezek szerint az AFP expressziójában inkább a tápközeg összetétele játszik kulcsfontosságú szerepet. Az együtt-tenyésztés során megváltozott pH-érték, tápanyagellátottság és különböző stresszfaktorok fokozzák az AFP expresszióját, melyhez a kompetitor gomba közvetlen jelenléte szintén hozzájárul valamilyen módon. Meyer és Stahl (2003) vizsgálatai alapján a *F. oxysporum* emelkedő peptonkoncentráció esetén (0,1-1%) feltételezhetően egy szignálmolekulát termel, amit az *A. giganteus* érzékelve képes tovább fokozni az *afp* gén expresszióját. Mint a fenti példákból is kitűnik, az AFP biológiai szerepe összetett, és az élőhelyért folytatott versenyben betöltött szerepe nagymértékben függ a kompetitorok jelenlététől és azok fiziológiai állapotától (Meyer és Stahl, 2002; Meyer, 2008).

A PAF esetén bizonyították a konidiogenezisben betöltött szerepét. A *paf* gén deléciója 70%-kal csökkentette a *P. chrysogenum* spórázási képességét a vad típushoz képest. A vegetatív növekedésre, hifamorfológiára és csírázási képességre a deléció nem volt hatással. A PAF feltételezhetően transzkripciós szinten fokozza a *P. chrysogenum* konidiogenezisét, ugyanis a Δpaf törzsben a sporulációt jelző *brlA* gén transzkripciója represszált lett (Hegedűs és mtsai., 2011a). A *brlA* gén a fonalgombákban szerepet játszik mind a konidiogenezis, mind az autolízis szabályozásában (Adams és mtsai., 1998; Emri és mtsai., 2008). Süllyesztett, szénéhező tenyészetben (amiben a PAF nagy mennyiségben termelődik) bizonyították, hogy a PAF nem játszik szerepet a *P. chrysogenum* autolízisének szabályozásában. A PAF biológiai szerepe feltételezhetően a felületi tenyészetekre korlátozódik, ahol megfelelő környezeti szignálok hatására a termelő törzs differenciálódási folyamatai érvényesülnek (García-Rico és mtsai., 2008; Hegedűs és mtsai., 2011b).

Általánosan elfogadott elmélet szerint fonalgombák által termelt, defenzinszerű antimikrobiális fehérjék a termelő szervezet védekező rendszerének a tagjai, amelyekkel

feltételezhetően a tápanyagokért folyó versenyben részt vevő, hasonló ökológiai niche-t elfoglaló gombák ellen veszik fel a harcot (Meyer, 2008). A fent említett hipotézisek alátámasztása, illetve az *afp* és *paf* stresszfüggő szabályozással való kapcsolatának felderítése még további vizsgálatokat igényel.

3.2.1.1.6. Potenciális alkalmazási lehetőségek

Az eddigi vizsgálatok alapján a fonalgombák által termelt, PAF-klaszterrel rendelkező defenzinszerű antifungális proteinek számos tulajdonsága megfelel az újonnan kifejlesztendő, a gyógyászatban, a növény- és termésvédelemben használatos antifungális szerekkel támasztott legfontosabb követelményeknek (Meyer és Stahl, 2003; Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2007, 2008; Meyer, 2008). Egymástól eltérő módon és hatékonyan gátolják számos mezőgazdasági és egészségügyi szempontból jelentős gombafaj spóráinak csírázását és hifáinak növekedését (**2. Táblázat**) (Moreno és mtsai., 2003, 2006; Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2007, 2008; Barna és mtsai., 2008; Meyer, 2008). Növényi- és emlőssejtekre nincsenek toxikus hatással, *in vivo* nem váltanak ki gyulladást, valamint stabilitásukat különböző környezeti körülmények között is megőrzik (Oldach és mtsai., 2001; Vila és mtsai., 2001; Moreno és mtsai., 2003, 2005, 2006; Coca és mtsai., 2004; Szappanos és mtsai., 2005, 2006; Girgi és mtsai., 2006; Barna és mtsai., 2008; Batta és mtsai., 2009; Palicz és mtsai., 2013). Képesek más antifungális szerekkel szinergista és/vagy additív kölcsönhatásba lépni, azok hatékonyságát megnövelni (Galgóczy és mtsai., 2007, 2008).

Az AFP az V-ös és III-as típusú kitin-szintázok specifikus gátlása révén ígéretes eszközzé válhat a növényvédelemben. Ezek az enzimek ugyanis kulcsfontosságú szerepet töltenek be a növényi kórokozó gombák patogenitásában (Meyer, 2008). Felületi szerként alkalmazva az AFP a rizs és a muskátli levelén védelmet biztosít *Magnaporthe grisea* és *Botrytis cinerea* fertőzésével szemben még az alkalmazást követő 2, illetve 6 hét elteltével is (Vila és mtsai., 2001; Moreno és mtsai., 2003, 2006; Coca és mtsai., 2004). Az AFP-vel előzetesen kezelt paradicsomgyökér a *F. oxysporum* fertőzéssel szemben megnövekedett ellenállóképességgel rendelkezik (Theis és Marx, 2005). Barakat és munkatársai (2010) bizonyították, hogy az AFP képes a raktári kártevőként ismert különböző *Fusarium* fajok növekedést visszaszorítani az árpán, így a termés mikotoxintartalmát csökkenteni. Az *afp*-t tartalmazó transzgénikus növények kevésbé bizonyulnak fogékonynak potenciális

gombapatogénjeikkel szemben: Az AFP jelentősen visszaszorította a transzgénikus búza, rizs, illetve gyöngyköles kártevői (*Erysiphe graminis* és *Puccinia recondita*; *M. grisea*; *Sclerospora graminicola* és *Puccinia substriata*) által okozott fertőzési tüneteket (Oldach és mtsai., 2001; Coca és mtsai., 2004; Moreno és mtsai., 2005; Girgi és mtsai., 2006). A fent említett kísérletek során az AFP nem károsította a növényt, az normális növekedést és morfológiát mutatott és a fertilitását is megőrizte (Meyer, 2008).

Antifungálisan hatékony koncentráció-tartományban sem az AFP, sem a PAF nem idéz elő citotoxikus és egyéb károsító hatást emlősejteken *in vitro*, továbbá, nem indukálja gyulladáshoz citokinek termelődését (Szappanos és mtsai., 2005, 2006). A PAF gyógyászati alkalmazásának esélyét növeli az a tény, hogy a fehérje *in vivo* sem váltott ki gyulladáshoz vezető folyamatot egér tüdőaszpergillózis-modellben (Palicz és mtsai., 2013).

In vitro kísérleti rendszerben igazolták, hogy a fonalgombák által termelt, defenzinszerű antimikrobiális fehérjék képesek kölcsönhatásba lépni más szerekkel, ezáltal erősebb gátló hatást kifejteni annál, mintha önmagukban alkalmaznánk őket. A PAF képes szinergisztikus kölcsönhatásba lépni sztatinokkal és flukonazollal, azok terápiásan hatékony koncentrációit jelentősen lecsökkentve (Galgóczy és mtsai., 2007, 2008). Additív kölcsönhatást írtak le a növénypatogén *Botrytis cinerea* ellen az AFP és egy *Cecropia* molyból izolált antifungális peptid, a cecropin A kombinációja esetén (Moreno és mtsai., 2003).

A diszulfid-hidak által stabilizált harmadlagos szerkezetüknek köszönhetően a fehérjék még különböző extrém környezeti körülmények között is megőrzik stabilitásukat (Vila és mtsai., 2001; Moreno és mtsai., 2003; Batta és mtsai., 2009). Az AFP jelentős rezisztenciát mutat proteolízissal és magas hőmérsékletű kezeléssel (80 °C) szemben, továbbá viszonylag stabilnak mutatkozik tág pH tartományban (pH 2-12) is (Vila és mtsai., 2001). Az AFP-hez hasonlóan a PAF is stabilnak bizonyul pH 1,5-11 között. Hőkezelés (60-80 °C, 10-60 perc) hatására a fehérje antifungális aktivitása részlegesen (20%), míg extrém körülmények között (95-100 °C, 60 perc) jelentős mértékben (~90-95%) csökken. Fehérjedegradációs kísérletekben (3-9 óra; pepszin, proteináz K, pronáz) a PAF megőrzi aktivitását, mely azonban hosszan tartó proteolitikus kezelés (12 és 24 óra; pronáz, proteináz K) következtében viszont jelentősen csökken. Az ACLA az előző két fehérjéhez hasonló stabilitással rendelkezik: extrém körülmények között, 3 óra 100°C-os hőkezelés után is 80%-os aktivitással bír, továbbá tág pH tartományban (pH 5-12) is aktívnak mutatkozik (Skouri-Gargouri és mtsai., 2010).

Mindezek ellenére még számos tényező gátolja gyakorlati célú felhasználásukat. Egyik ilyen tényező az, hogy a termelő gomba, még a termelődés szempontjából figyelembe vehető stresszkörülmények alkalmazása ellenére is viszonylag kis mennyiségben választja ki a fehérjét, ezért ipari mennyiségben történő előállításuk nem megoldott. További hátráltató tényező a fehérjék nem teljesen felderített hatásmódja, és az a tény, hogy egyes fehérjék csak bizonyos penészgombacsoportok ellen hatásosak (Marx, 2004; Theis és Stahl, 2004; Hegedűs, 2013).

Toxicitás-tesztek és további hatásvizsgálatok után a fonalgombák által termelt, defenzinszerű antimikrobiális fehérjék alkalmazhatók lehetnek új, fehérjén alapuló gombaellenes stratégiák kifejlesztésére mind a gyógyászatban, mind a növényvédelemben, mind az élelmiszertartósításban, illetve a kulturális örökségeink (pl. festmények, freskók, épületek) penészkártevői elleni védekezésben.

4. Célkitűzések

Az utóbbi két évtizedben felfedezett, a fonalasszombák által termelt, kis molekulatömegű, defenzinszerű antifungális proteinek hatékonyan gátolják számos gomba növekedését, valamint spóráinak csírázását. A rendszertanilag távol álló gombafajok által termelt, szerkezetileg hasonló proteinek hatásmódja és antimikrobiális spektruma jelentősen eltér egymástól, így külön-külön is értékes alapot szolgáltathatnak alap- és alkalmazott kutatások számára.

A *N. fischeri* NRRL 181 antifungális protein (NFAP) egy, a *N. fischeri* NRRL 181 genomjában megtalálható szekvenciából származtatott hipotetikus antifungális protein (ProteinID: XP_001262586), jelenléte csak *in silico* bizonyított (GeneID: 4589416). Klónozásáról, izolálásáról, antimikrobiális spektrumáról, hatásmódjáról és biológiai szerepéről nem számoltak be a jelen dolgozat elkészültéig.

Munkánk célja volt, hogy bővítsük a fonalasszombák által termelt, defenzinszerű antimikrobiális proteinekről meglévő ismereteinket az NFAP tanulmányozásával. Ezek alapján a következő konkrét célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. **Az NFAP-t kódoló gén izolálása *N. fischeri* NRRL 181 izolátumból.** Az *nfap* klónozása és izolálása, promóter régiójának feltárása.
2. **Az NFAP izolálása, szerkezetének, antimikrobiális tulajdonságainak és hatásának vizsgálata.** Az NFAP termeltetésére optimalizált táptalaj és tenyésztési körülmények kidolgozása. A protein tisztítása, *in vitro* antimikrobiális aktivitásának vizsgálata, szerkezetének meghatározása *in silico* módszerekkel.
3. **Az NFAP filogenetikai kapcsolatainak feltárása.** Az NFAP és más tömlősgomba-eredetű, defenzinszerű proteinek evolúciós kapcsolatának a vizsgálata.
4. **Az NFAP hatásmódjának a vizsgálata.** Az NFAP heterológ expressziója egy előzetesen érzékenynek bizonyult gombatorzsban. A heterológ rendszer hatékonyságának és a termelt protein *in vitro* antimikrobiális tulajdonságainak vizsgálata. Az NFAP hatásának vizsgálata a termelő, érzékeny gombatorzsban.
5. **Az NFAP biológiai szerepének a vizsgálata.** A *N. fischeri* NRRL 181 izolátum esetében az NFAP-t kódoló gént érintő deléciós mutáns előállítása. A vad és deléciós törzs növekedésének vizsgálata eltérő táptalajokon. Kompetíciós kísérletek végrehajtása a mutáns és vad típusú törzsekkel hasonló élőhelyet elfoglaló gombaizolátumokkal szemben *in vitro* antagonizmus tesztben.

5. Anyagok és módszerek

5.1. A vizsgálatokban szereplő mikroorganizmusok

3. Táblázat. A dolgozatban vizsgált fonalgombák.

Fajnév	Az izolátum kódja, törzsgyűjteményes száma	Az izolálás adatai, egyéb adatok
Tömlősgombák		
<i>Aspergillus carbonarius</i>	SZMC 2066	n.a.
<i>Aspergillus giganteus</i>	IMI 343707	n.a.
<i>Aspergillus japonicus</i>	SZMC 2157	n.a.
<i>Aspergillus nidulans</i>	CS2902	Genotípus: <i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>pyroA4</i> , <i>riboB2</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	SZMC 20660	CS2902 <i>nfap</i> transzformáns
<i>Aspergillus nidulans</i>	SZMC 0307	n.a. , Glasgow, Skócia
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2608 (SZMC 601)	n.a.
<i>Aspergillus terreus</i>	SZMC 2414	Keratomikózis; Dél-India
<i>Botrytis cinerea</i>	NCAIM F 00751	n.a.
<i>Fusarium cerealis</i>	SZMC 11048	n.a.
<i>Fusarium graminearum</i>	SZMC 11030	n.a.
<i>Fusarium graminearum</i>	SZMC 11054	n.a.
<i>Fusarium poae</i>	SZMC 11045	n.a.
<i>Fusarium polyphialidicum</i>	SZMC 11042	n.a.
<i>Neosartorya fischeri</i>	NRRL 181	befőtt (alma), étel
<i>Neosartorya fischeri</i>	n.a.	Δ <i>nfap</i> mutáns
<i>Penicillium chrysogenum</i>	IMI 392 788	n.a.
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	UAMH 7955	Szinusz
Járomspórás gombák		
<i>Absidia corymbifera</i>	SZMC 95033 (SZMC 11072)	n.a.
<i>Actinomucor elegans</i>	NRRL 1706	n.a.
<i>Backusella circina</i>	NRRL 3293	n.a.
<i>Gilbertella persicaria</i>	IMI 101638(+)	n.a.
<i>Mortierella nantahalensis</i>	NRRL 5842	n.a.
<i>Mortierella ramanniana</i>	NRRL 5844	n.a.
<i>Mortierella wolfii</i>	CBS 651.93	Gombakomposzt; Horst, Hollandia
<i>Mucor piriformis</i>	SZMC 12078	Nektarin; California, USA
<i>Mucor rammanianus</i>	WRL CN(M)304	n.a.
<i>Mycotypha africana</i>	NRRL 2978	n.a.
<i>Rhizomucor miehei</i>	CBS 360.92	Humán mikózis; Melbourne, Ausztrália
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	CBS 102.277	Humán mikózis
<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 146.90	Humán mikózis; Hollandia
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	SZMC 11084	n.a.

n.a.: nincs adat

5.2. Alkalmazott tápközegek, tenyésztési körülmények

5.2.1. Alkalmazott tápközegek

AFPIM (antifungális protein indukáló tápoldat, *antifungal protein induction medium*): 15 g/l keményítő, 10 g/l húskivonat, 20 g/l pepton, 5-30 g/l NaCl, és 0-1% (v/v) etanol; pH=6,8.

CM (komplett táptalaj/tápoldat, *complete medium*): 5% (v/v) sóoldat, 10 g/l D-glükóz, 0,85 g/l NaNO₃, 0,1% (v/v) vitaminoldat, 1,5 g/l kazaminosav, 2 g/l pepton, 1 g/l élesztőkivonat, szükség szerint 1 g/l uracillel és 1 g/l uridinnel, valamint 50-50 vagy 100-100 mM KCl-dal, Mg₂SO₄-tal, vagy Na₂SO₄-tal kiegészítve; pH=6,8. Táptalaj készítése estén 20 g/l, fedőagar készítése esetén 7,5 g/l agart használtunk.

Sóoldat: 26 g/l KCl, 26 g/l MgSO₄×7H₂O, 76 g/l KH₂PO₄, 5% (v/v) nyomelemoldat.

Nyomelemoldat: 40 mg/l Na-borát, 400 mg/l CuSO₄×5H₂O, 714 mg/l FePO₄, 728 mg/l MnSO₄×H₂O, 800 mg/l Na₂MoO₄×2H₂O, 8 mg/l ZnSO₄×7H₂O.

Vitaminoldat: 40 mg/l pantoténsav, 40 mg/l para-aminobenzoésav, 50 mg/l riboflavin, 25 mg/l piridoxin, 0,1 mg/l biotin, 50 mg/l tiamin.

MEA (malátás táptalaj/tápoldat, *malt extract agar/medium*): 5 g/l malátakivonat, 5 g/l élesztőkivonat, 5 g/l D-glükóz, 10 g/l KH₂PO₄; pH=7,0. Táptalaj készítése estén 20 g/l, agart használtunk.

MM (minimál tápoldat/táptalaj, *minimal medium*): 5% (v/v) sóoldat, 10 g/l D-glükóz, 0,85 g/l NaNO₃, táptalaj esetén 20 g/l agarral, illetve szükség esetén 0,4 g/l *pyrithiamine*-nel kiegészítve; pH=6,8. Fedőagar készítése esetén 7,5 g/l agart használtunk.

YEPG (élesztőkivonat-pepton-glükóz táptalaj/tápoldat, *yeast extract-peptone-glucose medium*) 1 g/l élesztő kivonat, 0,5 g/l pepton, 20 g/l glükóz; táptalaj előállításához 20 g/l agarral kiegészítve; pH=7,0.

5.2.2. Alkalmazott tenyésztési körülmények

A járomspórás- és a tömlősgombafajokat MEA és CM (*A. nidulans* esetén) táptalajon, 4 °C-on tartottuk fenn. A spóraszuszpenziók készítéséhez a fenntartáshoz alkalmazott táptalajon nevelt, spóráztatott tenyészeteket használtuk; az inkubációs hőmérséklet fajtól függően 20-37 °C között mozgott.

Az NFAP termelésének optimalizálásához az AFPIM eltérő NaCl- és etanol-tartalmú kombinációit próbáltuk ki. A fehérje termeltetése AFPIM tápoldatban, 168 óráig, 25 °C-on, 220 rpm-en rázatva történt.

Az antifungális hatásvizsgálatokhoz YEPG, MM és CM táptalajt és tápoldatot használtunk a vizsgált kísérleti körülménytől függően, az inkubációs hőmérséklet fajtól függően 20-37 °C között mozgott.

A transzformációs kísérletekhez MEA, CM és MM táptalajokat használtunk, az inkubációs hőmérséklet fajtól függően 30-37 °C között mozgott.

A DNS és RNS kivonásához a gombákat MEA vagy CM tápoldatban, 25-37 °C-on, 3 napon keresztül, 200 rpm-en rázatva neveltük.

5.3. Alkalmazott pufferek, oldatok és reagensek

Spóraszuszpenzió készítéséhez használt oldat:

0,01% Tween 80.

Nukleinsav gélelektroforézishez használt anyagok:

TAE puffer: 40 mM Tris-HCl (pH=7,6), 1 mM Na₂EDTA.

Agaróz gél: a vizsgált DNS szakasz méretétől függően 0,8-1% agaróz, TAE pufferben.

DNS festék: 1×*SYBR Safe* (Life Technologies) DNS festék törzsoldat vagy 0,5 µg/ml etídium-bromid törzsoldat (Sigma-Aldrich) az agaróz gélben.

Mintapuffer: 6×DNS mintapuffer (Thermo Scientific).

Molekulasúlymarker: *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific); *pUC Mix Marker* (Thermo Scientific), *DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled* (Roche).

Fehérje gélelektroforézishez használt anyagok:

4-12%-os Bis-Tris gél (NuPAGE, Novex, Life Technologies).

1× MES puffer (pH 7,3; Life Technologies).

Fehérje molekulasúlymarker: *SeeBlue® Plus2 Protein Standard* (Life Technologies).

Poliakrilamid gél festéséhez használt oldatok:

Coomassie-kék festés:

Coomassie festőoldat: 0,0025% *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 40% metanol, 7% ecetsav.

1. mosó oldat: 40% metanol, 7% ecetsav.

2. mosó oldat: 5% metanol, 3,5% ecetsav.

Ezüst-festés:

Fixáló oldat: 50% metanol, 12% ecetsav, 0,05% formaldehid.

Szenzitizáló oldat: 0,02% Na₂S₂O₃.

Előhívó oldat: 0,0004% Na₂S₂O₃, 6% NaCO₃, 0,05% formaldehid.

A genomi DNS izolálásához használt anyagok:

LETS puffer: 0,1 M LiCl, 10 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH=8), 0,5% SDS.

100 mg/ml RNáz (Qiagen) törzsoldat.

PCI: fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke.

3 M Na-acetát, pH= 4,5.

TE puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA.

CI: kloroform–izoamil alkohol 24:1 arányú keveréke.

DNS tisztító kit: *MasterPure Yeast DNA Extraction Kit* (Epicentre).

Szkenning elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz használt oldatok:

Előfixáló oldat: 2,5% glutáraldehid, 0,133 M Sørensen-féle foszfát puffer (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH=7,2).

Protoplasztiképzéshez és transzformációhoz használt oldatok:

Protoplasztáló oldat: 1,5% csigaenzim és 0,5% *Lysing Enzymes from Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich), 0,7 M KCl, 25 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH=5,8) puffer.

Transzformáláshoz használt 1. oldat: 1 M szorbitol, 10 mM Tris-HCl (pH=7,5).

Transzformáláshoz használt 2. oldat: 1 M szorbitol, 10 mM Tris-HCl (pH=7,5), 10 mM CaCl₂.

Transzformáláshoz használt 3. oldat: 60% PEG 4000, 10 mM Tris-HCl (pH=7,5), 10 mM CaCl₂.

DNS-blottoláshoz használt oldatok:

Nátrium-lauril-szulfát (SDS) oldat: 10% SDS.

Depurináló oldat: 0,25 M HCl.

Denaturáló oldat: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl.

Neutralizáló oldat: 0,5 M Tris, 1,5 M NaCl (pH 8,0).

20×nátrium-klorid - nátrium-citrát (SSC) oldat: 3 M NaCl, 0,3 M nátrium-citrát (pH 7,0).

Hibridizációhoz használt oldatok és reagensek:

Hibridizációs puffer: 5×SSC, 0,1% nátrium-lauril-szarkozinát, 0,02% SDS, 1% *Blocking Reagent* (Roche).

Mosó pufferek: 2×SSC, 0,1% SDS és 0,1×SSC, 0,1% SDS.

1. detektáló puffer: 0,01 M maleinsav, 0,015 M NaCl (pH 7,5).

2. detektáló puffer: 1% blokkoló reagens (Roche) 1. detektáló pufferben.

3. detektáló puffer: 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂ (pH 9,5).

Alkalikus foszfatáz-antitest konjugátum: *Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments* (Roche).

Színreakción alapuló előhíváshoz: nitroblue-tetrazolium-klorid - bromo-4-kloro-3-indolilfoszfát (NBT-BCIP) törzsoldat (*DIG DNA Labeling and Detection Kit*, Roche).

5.4. Alkalmazott indítószekvenciák

4. Táblázat. Az amplifikálásokhoz használt indítószekvenciák.

Név	Szekvencia 5'-3'	Tervezés alapja	T _m *	Amplifikált DNS szakasz
PRIMER2F	CAT CGC CCA CCA AAC ATG GTT AT	<i>nfap</i> -824-802. bp	58,0 °C	1954 bp
PRIMER2R	TGC TTT GCC TGA AGA GTC TTT TGA AG	<i>nfap</i> 1108-1136. bp	57,8 °C	
PRIMER1F	ATG CAG ATC ACT AAG ATT TCC C	<i>nfap</i> 1-22. bp	52,5 °C	285 bp
PRIMER1R	TCA ATG GCG GAA GTC ACA C	<i>nfap</i> 391-409. bp	55,4 °C	
PRIMER1FP	GGC <u>CCC</u> ATG GAG ATC ACT AAG ATT TCC C	<i>nfap</i> -6-+22. bp	62,2 °C	301 bp
PRIMER1RP	GGC <u>CGG</u> ATC CTC AAT GGC GGA AGT CAC ACT TG	<i>nfap</i> 388-419.bp	67,8 °C	
o5nfapNF	GGC AAT GAA TCA GAA GTG GA	<i>nfap</i> -2006-1987. bp	52,8 °C	1810 bp
o5nfapAR1	AGC CGA AGG ATT GTT GAG	<i>nfap</i> -214-197. bp	52,3 °C	
o3nfapCF1	ACC AGG AAG TGT GAG ATGC	<i>nfap</i> 40-58. bp	54,7 °C	1951 bp
o3nfapNR	AAG CCC AAG GAT TCA GAT AC	<i>nfap</i> 1971-1990. bp	52,0 °C	
onfapBF	CTC AAC AAT CCT TCG GCT CGC GTA ATA CGA CTC ACT AT	psk275 622-642. bp és <i>nfap</i> -214-197. bp	64,8 °C	2200 bp
onfapBR	ACC ATG ATT ACG CCA AGC GCA TCT CAC ACT TCC TGG T	psk275 2806-2823. bp és <i>nfap</i> 40-58. bp	68,1 °C	
DJforw	ACT TTT GCC ACC CAC CTG	<i>nfap</i> -2006-1987. bp	55,8 °C	5913 bp
DJrev	TCC TGT TCA CCC TTT GCT G	<i>nfap</i> 1971-1990. bp	55,2 °C	
o5nfapA1	CAG CTG TCA CGC TGT GGC AGT TGC	<i>nfap</i> -2099-2076. bp	64,9 °C	6228 bp
o3nfapA2	CAT CAG GTG ATT TGG GAC GGT AAG	<i>nfap</i> 2177-2200. bp	57,6 °C	
nfAnestF	ATG CAG ATC ACT AAG ATT TCC CTT TTC CTG	<i>nfap</i> 1-30.bp	58,6 °C	409 bp
nfCnestR	TCA ATG GCG GAA GTC ACA CTT GAC CTT TC	<i>nfap</i> 381-409. bp	62,3 °C	
optrA1	GAG GAC CTG GAC AAG TAC	psk275 1648-1665. bp	51,7 °C	528 bp
optrA2.1	CCC CAA CAC TAT CAA CGC	psk275 2158-2175. bp	53,6 °C	

*50 mM NaCl koncentráció esetén

Az aláhúzott nukleotidok a restriktációs felismerőhelyeket jelölik.

5.5. Alkalmazott módszerek

5.5.1. Az NFAP izolálása

Az NCBI adatbázisában megtalálható, feltételezett NFAP-t kódoló gén alapján (GeneID: 4589416) izoláltuk az *nfap*-t a *N. fischeri* NRRL 181 izolátumból. A kódoló régió meghatározása után izoláltuk az NFAP-t a *N. fischeri* NRRL 181 fermentlevéből.

5.5.1.1. Az NFAP-t kódoló gén és határolórégióinak izolálása

A MEA tápoldatban felnövesztett *N. fischeri* NRRL 181 micéliumait desztillált vízzel mostuk, majd folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban porítottuk. LETS puffert (2,5 ml/1 g micélium), RNáz-t (20 µg/ml koncentrációban) és PCI-t adtunk hozzá 1:1 arányban, majd elkevertük. Centrifugálást (20 000×g, 20 perc, 4 °C) követően a felülúszóhoz etanolt (2,5:1) és Na-acetátot (1:0,1) adtunk. A kicsapódott nukleinsavat (1 óra, -70 °C) centrifugálással (26 000×g, 25 perc, 4 °C) gyűjtöttük és a felülúszó leöntése után a csapadékot beszárítottuk. A mintát TE pufferben oldottuk, 1:1 arányban PCI-vel kezeltük, majd centrifugáltuk (13 000×g, 10 perc). Ezt követően CI-vel kezeltük, centrifugáltuk (17 000×g, 10 perc) és újból kicsaptuk. A csapadékot lecentrifugáltuk, 70%-os etanollal mostuk, beszárítottuk, majd 50 µl desztillált vízben feloldottuk és -20 °C-on tároltuk.

Az így izolált genomi DNS-t használtuk az *nfap* gén izolálása során, aminek az alapja az NCBI adatbázisában megtalálható feltételezett antifungális hatással rendelkező proteint (NFAP, ID: XP_001262586) kódoló gén (*nfap*, GeneID: 4589416) alapján tervezett, PRIMER2F és PRIMER2R indítószekvenciákkal végrehajtott polimeráz láncreakció (PCR) volt.

A PCR-hez használt reakcióelegy a következő volt:

1x Dupla-Taq puffer (Zenon Bio)
0,5 mM dNTP mix (Thermo Scientific)
0,4 µM primer
2,5 mM MgCl₂
5 pg genomi DNS
2 U Taq DNS-polimeráz (Zenon Bio)

A reakciókörülmények a következők voltak:

1 ciklus:	denaturálás	94 °C / 3 perc
30 ciklus:	denaturálás	94 °C / 40 másodperc
	indítószekvencia kötődés	58 °C / 30 másodperc
	láncszintézis	72 °C / 40 másodperc
1 ciklus:	végső láncszintézis	72 °C / 7 perc

A DNS-szakasz amplifikálását *MJ Mini™ Personal Thermal Cycler*-ben (Bio-Rad) hajtottuk végre.

5.5.1.2. Az NFAP-t kódoló cDNS izolálása

A feltételezett *nfap* kódoló régióinak meghatározásához izoláltuk az NFAP-t kódoló cDNS-t. Ennek első lépéseként totál RNS-t tisztítottunk a *N. fischeri* NRRL 181 NFAP indukciója szemponjából optimalizált tápközegeben felnevesztett micéliumaiból (ld. 5.1.1.2. fejezet) az *E.Z.N.A. Fungal RNA Kit* (Omega Bio-tek) használatával, a gyártó utasításai alapján. Az amplifikálási reakciók előtt a tisztított RNS-mintát DNáz-zal kezeltük (DNase I, 30 U; Thermo Scientific) 37 °C-on 30 percen át.

Az NFAP-t kódoló cDNS szintézisét a *Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific) használatával, a gyártó utasításai alapján végeztük el. A cDNS amplifikálása során alkalmazott (PRIMER1F és PRIMER1R indítószekvenciák) elegy megegyezett az előző (5.5.1.1.) fejezetben leírtakkal.

Az alkalmazott reakciókörülmények a következők voltak:

1 ciklus:	denaturálás	94 °C / 2 perc 30 másodperc
30 ciklus:	denaturálás	94 °C / 30 másodperc
	indítószekvencia kötődés	48 °C / 1 perc
	láncszintézis	72 °C / 1 perc
1 ciklus:	végső láncszintézis	72 °C / 7 perc

A PCR-termékeket gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a gélből *Gel-M Gel Extraction System* (Viogene) használatával visszaizoláltuk. A szekvenciák meghatározását az LGC Genomics (Berlin, Németország) munkatársai végezték. A szekvenogramok kiértékeléséhez a *BioEdit* (Hall, 1999) és az NCBI honlapján található *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul és mtsai., 1990; BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) programokat használtuk.

5.5.1.3. Az NFAP izolálása *N. fischeri* NRRL 181 fermentléből

A *N. fischeri* NRRL 181 centrifugált (30 perc, 10 000×g, 4 °C) és steril gézlapon átszűrt fermentlevét 80% ammónium-szulfáttal kisértük 4 °C-on, majd a csapadékot 20 mM Tris-HCl pufferrel (pH=7,2) szemben dializáltuk (*SnakeSkin™ Dialysis Tubing*, 3,5 kDa, Thermo Scientific). Az 1/5 térfogatra töményített mintát géliszűrési kromatográfiával (*Sephadex G-50 Superfine*, GE Healthcare) tisztítottuk. Az antifungális aktivitással rendelkező frakciókat egyesítettük és 6-szorosára töményítettük. A 10 kDa alatti frakciót ultracentrifugálással (Spin-X UF 20ml, 10K, Corning) elválasztottuk a gyártó utasításai alapján, majd újbóli dialízis után ioncserés kromatográfiával tisztítottuk CM-szefaróz oszlopon (CM Sepharose Fast Flow, Sigma-Aldrich). Az elúcióhoz az ekvibráló pufferben (20 mM Tris-HCl puffer, pH=7,2) oldott emelkedő NaCl koncentrációt (0,1-1,0 M) használtunk. A tisztított fehérjét ismételt dialízis után 5-szörösére töményítettük, dializáltuk, végül sterilre szűrtük (*Millex-HP filters*, 0,45 µm, Millipore). A fehérje tisztaságát nátrium-lauril-szulfát - poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) Coomassie-kék (esetenként ezüst-) festéssel ellenőriztük. A fehérje koncentrációt *Quant-iT Protein Assay Kit* (Invitrogen) és *Qubit Fluorometer* (Invitrogen) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően.

Coomassie-kék festés

Az SDS-PAGE géleket 2-16 órán át Coomassie-kék festőoldatban rázattuk. A festőoldat eltávolítását követően a gél 1 órán át egyszer cserélve az 1. mosó oldattal, majd 2 órán át egyszer cserélve a 2. mosó oldatban lassan rázattuk (45 rpm).

Ezüst festés

A Coomassie-kék festés után történt. A gél 2 órán keresztül fixáló oldattal, majd háromszor 20 percig 20% etanollal és 2 percen át szenzitizáló oldattal kezeltük. Kétszer egy perces desztillált vizes mosást 20 perces, 0,2% AgNO₃ oldattal történő festés, majd egy perces desztillált vizes öblítés követett. Az előhívó oldatban a proteinsávok megjelenéséig rázattuk a gél, majd 96%-os ecetsavval állítottuk le a reakciót, végül a gél desztillált vízzel öblítettük.

A gélek kiértékelése gél dokumentációs rendszerrel (UVP), UV-szűrő használatával történt.

N-terminális szekvenálás

Az NFAP első hat, N-terminális aminosavát Edman-féle szekvenálással (*ABI Procise Model 492 Edman Micro Sequencer; ABI Model 140C PTH Amino Acid Analyzer*-rel) határozták meg az Innsbrucki Orvosi Egyetem munkatársai (Innsbruck, Ausztria).

5.5.2. Az NFAP antifungális hatásának vizsgálata

Az NFAP feltételezett antifungális aktivitásának vizsgálatára agardiffúziós és mikrodilúciós módszereket alkalmaztunk.

5.5.2.1. A gombaspórák csírázókéességének vizsgálata NFAP jelenlétében

Az NFAP hatását a gombaspórák csírázókéességére mikrodilúciós tesztekben vizsgáltuk 96 lyukú mikrotiterlemezen, 620 nm hullámhosszúságú fény abszorbanciájának mérésével (Jupiter HD univerzális mikrotiterlap-leolvasó interferenciaszűrővel, ASYS Hitech GmbH). A vizsgálathoz 100 µl YEPG tápoldatban hígított NFAP-t (12,5-200 µg/ml, kétszeres hígítási sorban) elegyítettünk szintén YEPG tápoldatban oldott 100 µl spóraszuszpenzióval (10^5 spóra/ml). A mikrotiterlapokat 25 vagy 20 °C-on (*Mucor piriformis* esetén) inkubáltuk, az abszorbanciát 0, 24, 48 illetve 72 óra után mértük. Spektrometriai kalibrációhoz 200 µl steril YEPG tápoldatot használtunk. Növekedési kontrollként 100 µl YEPG tápoldatot és 100 µl 10^5 spóra/ml elegyét alkalmaztuk. A kísérlethez három párhuzamos leoltást használtunk. A gátlás mértékének megállapításához a növekedési kontrollok optikai denzitását tekintettük 100%-os növekedésnek.

5.5.2.2. Az NFAP antifungális hatásának vizsgálata *A. niger* csírázókéességére

Az előzetes kísérleteink alapján az NFAP-érzékeny *A. niger* SZMC 601 törzs csírázókéességének vizsgálatához 10^5 konídiumot oltottunk 400 µl NFAP-t (100 és 200 µg/ml végkoncentráció) tartalmazó YEPG tápoldatba, melyet 25 °C-on, 24 és 48 órán át inkubáltunk. Növekedési kontrollként NFAP-t nem tartalmazó YEPG tápoldatot használtunk. A csírázó konídiumokat és a fejlődő micélium morfológiai változásait fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

5.5.2.3. Mikroszkópos vizsgálat

Az NFAP-kezelt *A. niger* SZMC 601 csírázó konídiumat laktófenolkék festést követően fluoreszcens lámpával felszerelt fénymikroszkóppal (LR 66238C, Carl Zeiss, Axiolab) vizsgáltuk. A látómezőt digitális fényképezőgéppel (Nikon, Coolpix 4500) fényképeztük.

5.5.2.4. Az NFAP antifungális hatásának pH- és hőmérsékletfüggése, proteináz kezeléssel szembeni stabilitásának vizsgálata

A NFAP antifungális aktivitásának pH- és hőmérsékletfüggését, illetve proteináz kezeléssel szembeni ellenállóképességét agardifúziós módszerrel, az előző kísérletek alapján NFAP-érzékenynek bizonyuló *A. niger* SZMC 601 törzs bevonásával vizsgáltuk. A teszthez 20 ml szilárd YEPG táptalajra 1 ml 10^5 spóra/ml spóraszuszpenziót szélesztettünk, majd a lemezbe lyukakat fúrtunk, amikbe eltérő módon kezelt 150 μ l 200 μ g/ml koncentrációjú NFAP oldatot pipettáztunk. A gátlási zónák átmérőjét 25 °C-on 24, 48, 72, 96 és 120 órán át történő inkubáció után mértük. A pH-függés vizsgálatához az NFAP-t különböző pH értékű (pH=7,0-9,0) 20 mM Tris-HCl pufferben oldottuk. A hőmérsékletfüggés vizsgálatához az NFAP-t az előzetes kísérletek alapján az antifungális hatás szempontjából optimális pH-jú (pH=8,4) pufferben hígítva (200 μ g/ml, 20 mM Tris-HCl puffer), eltérő hőmérsékleti kezelést (30-100 °C, 30 perc) követően használtuk fel. Negatív kontrollként steril puffert használtunk. Az NFAP proteinázzal szembeni ellenállóképességének vizsgálata során az NFAP-t (200 μ g/ml, 20 mM Tris-HCl pufferben hígítva, pH=8,4) 1,25; 2,5; 5 és 10 mg/ml koncentrációjú proteináz K-val (Sigma-Aldrich) kezeltük 20 °C-on, 16 órán keresztül a gyártó utasításai alapján. Negatív kontrollként proteináz K-t tartalmazó steril puffert használtunk.

Minden kísérlethez három párhuzamos leoltást használtunk.

5.5.3. Az NFAP *in silico* szerkezetmeghatározása, filogenetikai analízis

Az NFAP és a szakirodalomban leírt PAF-klaszterrel rendelkező fehérjék szerkezetének összehasonlításához meghatároztuk az NFAP lehetséges harmadlagos szerkezetét *in silico*. Az evolúciós rokonsági kapcsolatok megállapításához elvégeztük a tömlősgombák defenzinszerű proteinjeinek aminosavszekvencia-alapú filogenetikai analízisét az **1. Táblázat**ban ismertetett PAF-klasztert tartalmazó proteinek és a következő BP-klasztert tartalmazó proteinek bevonásával: *P. brevicompactum* Dierckx BP

(GeneBank ID: AEQ36754), *A. fumigatus* Af29 AFBP (feltételezett, GeneBank ID: XP_731495), *N. fischeri* NRRL 181 NFBP (feltételezett, GeneBank ID: XP_003666363), *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 PCBP (feltételezett, GeneBank ID: XP_002568323), *C. globosum* CBS 148.51 CGBP (feltételezett, GeneBank ID: XP_00122783), *M. thermophila* ATCC 42464 MTBP (feltételezett, GeneBank ID: XP_003666363). A filogenetikai kapcsolatok vizsgálatához az éretlen proteinek aminosav-szekvenciáit használtuk fel.

5.5.3.1. In silico szerkezetvizsgálatok

Az érett NFAP fizikai és kémiai tulajdonságainak vizsgálatához az *Expert Protein Analysis System* (ExPASy, www.expasy.org) szerverén megtalálható, elsődleges proteinszerkezet-elemző szoftvereket használtuk (Watanabe és Harayama, 2001). A szignálszekvencia, az érett fehérje elsődleges szerkezetének az előrejelzéséhez és az NFAP harmadlagos szerkezetének a modellezéséhez a *SignalP 3.0 Server*-t (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/), *SCRATCH Protein Structure and Structural Feature Prediction Server*-t (www.ics.uci.edu/~baldig/scratch, University of California Irvine) és a *SWISS-MODEL Automated Protein Structure Homology Modeling* szerveret (www.swissmodel.expasy.org) használtuk (Watanabe és Harayama, 2001; Bendtsen és mtsai., 2004; Cheng és mtsai., 2005; Arnold és mtsai., 2006).

5.5.3.2. Filogenetikai analízis

A filogenetikai vizsgálatokhoz a *Methodes et Algorithmes pour la Bio-informatique* (<http://www.phylogeny.fr>) weblapon elérhető *PhyML 3.0 aLRT* szoftvert használtuk, a *Shimodaira-Hasegawa-like approximate likelihood ratio test* (SH-like aLRT) és *Whelan And Goldman substitution model* (WAG) alkalmazásával. A filogenetikai kapcsolatokat *TreeDyn* alkalmazás segítségével ábrázoltuk (Guindon és mtsai., 2003; Cheng és mtsai., 2005; Anisimova és Gascuel, 2006; Chevenet és mtsai., 2006; Dereeper és mtsai., 2008, 2010).

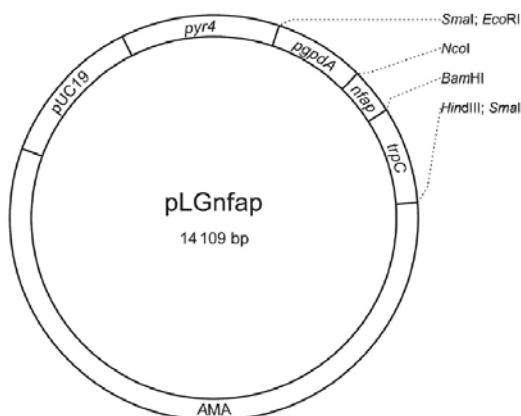
5.5.4. Az NFAP hatásmechanizmusának felderítéséhez használt módszerek

Annak érdekében, hogy az NFAP hatását a csírázás korai szakaszától kezdve követni tudjuk, előállítottunk egy, az NFAP konstitutív termelésére képes *A. nidulans* törzset: a kis mértékben NFAP-érzékeny *A. nidulans* CS2902 izolátumot a pLGnfap vektorral transzformáltuk.

5.5.4.1. A pLGnfap vektor konstrukciója

Az előbb említett NFAP-t termelő *A. nidulans* előállításához létrehoztuk az *nfap* cDNS-et tartalmazó autonóm replikatív pLGnfap plazmidot.

Az *A. nidulans* CS2902 törzs transzformációjához az NFAP-t kódoló cDNS-t *Nco*I és *Bam*HI restrikciós enzimekkel történő emésztés után a pANGFP plazmid (Pokorska és mtsai., 2000) megfelelő restrikciós hasítóhelyeire klónoztuk. Ebből a vektorból az *nfap* cDNS-et az 5' végén található *gpdA* promóter és a 3' végén található *trpC* terminális régióval együtt *Eco*RI és *Hind*III restrikciós endonukleázokkal kiemésztettük, majd Klenow (*DNA Polymerase I Large*, Thermo Scientific) kezelés után *Sma*I-emésztett pAMA1 vektorba klónoztuk (Osharov és May, 2000). Ez az autonóm replikatív konstrukció hordozza az *nfap* cDNS-et a pANGFP vektorból származó *gpdA* promóterrel és a *trpC* terminális régióval, valamint a pAMA1vektor pUC19 és *pyr4* régióit (**3. Ábra**).



3. Ábra. A pLGnfap autonóm replikatív plazmid. Rövidítések: *pgpdA*, *gpdA* promóter; *nfap*, NFAP cDNS; *trpC*, *trpC* terminális régió; AMA, pAMA1 vektorból származó DNS; pUC19, pUC19 régió; *pyr4*, *Neurospora crassa pyr4* régió.

A restrikciós emésztéseket 37 °C-on, 16 órán keresztül inkubáltuk, a reakcióelegyek összetétele a következő volt:

43 µl desztillált vízben oldott plazmid
4 µl megfelelő enzimpuffer (Thermo Scientific)
3-3 µl *Nco*I (30 U), *Bam*HI/*Eco*RI (30-30 U) és *Hind*III/*Sma*I
(30-30 U) restrikciós endonukleáz (Thermo Scientific)

Az emésztési reakciót 20 perces, 65 °C-on történő hőkezeléssel állítottuk le.

A ligálási reakciók 4 °C-on 16 órán át történtek. A reakcióelegyek összetétele a következő volt:

7 µl inszert DNS
1 µl emésztett pANGFP/pAMA1 plazmid
1 µl 10× T4 DNS ligáz puffer (Thermo Scientific)
1 µl T4 DNS ligáz (5 U) enzim (Thermo Scientific)

A ligálási reakciót 10 perces, 65 °C-on történő hőkezeléssel állítottuk le.

A Klenow-kezelés 37 °C-on, 10 percen át tartott. A reakcióelegy összetétele a következő volt:

10 µl (0,5 µg) DNS-fragment
2 µl 10× Klenow Fragment reakció puffer (Thermo Scientific)
0,5 µl dNTP mix (0,5 mM egyenként)
0,25 µl Klenow Fragment (2,5 U) (Thermo Scientific)
A kezelést 10 perces, 75 °C-on történő hőkezeléssel állítottuk le.

5.5.4.2. Az *A. nidulans* transzformációja

Az *A. nidulans* CS2902 törzs PEG-közvetített protoplaszt transzformációját pLGnfp vektorkonstrukció felhasználásával, az alábbiak szerint végeztük el.

Az *A. nidulans* CS2902 törzs uracillal és uridinnel kiegészített CM táptalajon nevelt tenyészetéről lemostuk a konídiospórákat, majd a spóraszuszpenzió egy-egy cseppjét az előbbivel megegyező táptalaj felszínére helyezett celofánkorongokra vittük fel oltókorong

segítségével. A 20 órán keresztül, 37 °C-on, celofánon nevelt fiatal telepeket protoplasztáló oldatba helyeztük. A sejtfal emésztése 28 °C-on, 90 percen keresztül történt, a protoplasztok leválását segítő óvatos, 45 rpm-en történő rázatással. A protoplasztokat tartalmazó oldatot centrifugáltuk (az összes esetben 2 100×g, 15 perc, 10 °C), az így összegyűjtött protoplasztokat 10 ml transzformáláshoz használt 1. oldattal mostuk, centrifugáltuk, majd a pelletet kétszer mostuk a transzformáláshoz használt 2. oldattal, majd újra centrifugáltuk. A protoplasztokat 300 µl transzformáláshoz használt 2. oldatban vettük fel, majd Bürker-kamra használatával számoltuk. 150 µl, (5×10^6) protoplaszthoz 10 µl (5 µg), pLGnfp vektort, 40 µl transzformáláshoz használt 2. oldatot és 50 µl transzformáláshoz használt 3. oldatot adtunk, majd a mintát jégen tartottuk 20 percen keresztül. Ezt követően a mintát 1 ml transzformáláshoz használt 3. oldattal egészítettük ki, melyhez 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után 5 ml transzformáláshoz használt 2. oldatot adtunk. Az így kapott elegyet 30 ml MM fedőagarral öntöttük fel, melyet 5 ml-enként osztottunk el szacharózzal kiegészített MM-agarlemezekre. A csészéket 37 °C-on, a transzformáns telepek megjelenéséig inkubáltuk (72-96 h). A pozitív klónokat tovább szelektáltuk MM-táptalajra áttöltéssel, mely után a további kísérletekhez a stabil klónokat használtuk fel.

A pLGnfp jelenlétét PCR-technikával, a vektor egy szakaszának, az *nfp* cDNS-ének amplifikációjával (PRIMER1FP és PRIMER1RP indítószekvenciák) ellenőriztük. A PCR-termék szekvenciájának meghatározását az LGC Genomics (Berlin, Németország) munkatársai végezték. A szekvenogramok kiértékeléséhez a *BioEdit* (Hall, 1999) és az NCBI honlapján található *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul és mtsai., 1990; BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) programokat használtuk. Az amplifikáció elegye és körülményei megegyeztek 5.5.1.2.-ben leírtakkal.

5.5.4.3. NFAP expressziója *A. nidulans* CS2902 törzsben

A heterológ NFAP (hNFAP) expressziójához az előzetes kísérleteink alapján optimálisnak bizonyult fermentációs körülményeket alkalmaztunk: 10^5 transzformáns *A. nidulans* konídium/ml-t oltottunk CM-táptalajba, melyet 37 °C-on, 120 órán keresztül, folyamatos rázatással inkubáltunk (160 rpm).

A hNFAP tisztítása és azonosítása az NFAP-val megegyező módon történt, negatív kontrollként nem transzformált *A. nidulans* CS2902 törzset használtunk.

5.5.4.4. A hNFAP antifungális hatásának vizsgálata *A. nidulans* növekedésére

A hNFAP (300-12,5 µg/ml) *A. nidulans* SZMC 0307 és *A. nidulans* CS2902 törzsekre gyakorolt antifungális hatásának vizsgálatát mikrodilúciós (10^4 , 10^5 és 10^6 konídium/ml-t alkalmazva) és agardiffúziós módszerrel (10^6 konídium/ml-t alkalmazva), az előző fejezetekben (5.5.2.2. és 5.5.2.4.) leírtak alapján végeztük el. Mikrodilúciós módszerrel megállapítottuk a hNFAP MIC-értékeit az *A. nidulans* CS2902 törzsszel szemben (10^4 , 10^5 és 10^6 konídium/ml).

Az *A. nidulans* CS2902 transzformánsok önmérgező hatásának vizsgálatához 10^4 , 10^5 és 10^6 konídium/ml-t oltottunk 10 ml CM tápoldatba, melyet 7 napig inkubáltunk folyamatos rázatás mellett (160 rpm) 37 °C-on. A micéliumok száraztömegét centrifugálást ($10\,000\times g$, 30 perc) követő, 24 órán át tartó liofilizálás után mértük le.

Negatív kontrollként az *A. nidulans* CS2902 törzset használtunk. A kísérletekhez 3 párhuzamos leoltást hajtottunk végre.

5.5.4.5. A hNFAP antifungális hatásának vizsgálata *A. nidulans* CS2902 transzformánsokra

A hNFAP-nek az NFAP-t termelő, pLGnfp transzformáns *A. nidulans* CS2902 törzs konídiumainak csírázására gyakorolt hatását 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Serva) és *Calcofluor white* (CFW; Sigma-Aldrich) festéssel vizsgáltuk. 10 ml CM tápoldatot tartalmazó lombikba 10^5 konídium/ml-t oltottunk, majd folyamatos rázatással (160 rpm) 37 °C-on inkubáltuk 8, 12 és 24 órán keresztül. Ezekből 1-1 ml mintát véve a csírázó konídiumokat centrifugálással összegyűjtöttük ($10\,000\times g$, 10 perc), majd a felülúszó leöntése után az összegyűlt csírázó konídiumokat az alábbi oldatokba szuszpendáltuk. A sejtmagok festése 1 ml 0,1 µg/ml DAPI oldatban történt szobahőmérsékleten 30 percig. A sejtfal festése 1 ml 1 µg/ml CFW-t tartalmazó KOH oldatban (15 %, w/ v) történt szobahőmérsékleten 10 percig. Centrifugálással (10 perc $10\,000\times g$) összegyűjtöttük a megfestett csírázó konídiumokat, majd desztillált vízzel kétszer mostuk és 50 µl desztillált vízben vettük fel.

A reaktív oxigénfajták (ROS) termelésének és felhalmozódásának vizsgálatához Leiter és munkatársai (2005) által leírt 2',7'-dikloro-dihidro-fluorescein-diacetát (H_2 -DCF) festési módszert alkalmaztuk, amihez a transzformáns törzsek konídiumait (10^5 /ml) CM-tápoldatban inkubáltuk folyamatos rázatással (160 rpm), 12 órán át 37 °C-on.

A lehetséges apoptotikus és nekrotikus események kimutatására az *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*-et (*Annexin V-FITC* és propídium-jodid (PI) kettős jelölés, Sigma-Aldrich) használtunk a gyártó utasításai szerint, amelyhez 10^5 transzformáns konídium/ml-t CM-tápoldatban folyamatos rázatással (160 rpm), 8, 10 és 12 órán át 37 °C-on inkubáltunk (Krizsán és mtsai., 2010).

Negatív kontrollként minden esetben nem transzformáns *A. nidulans* CS2902 törzset használtunk. Minden kísérletet három párhuzamos bevonásával végeztünk el.

5.5.4.6. Mikroszkópos vizsgálatok

Fény- és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok

A hNFAP *A. nidulans* CS2902 transzformánsokra gyakorolt antifungális hatását fény- és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk az 5.5.4.5 fejezetben leírt DAPI-, CFW-, H_2 -DCF, illetve *Annexin V-FITC* és PI kettős festés után.

A vizsgálatokhoz fluoreszcens lámpával felszerelt fénymikroszkópot (LR 66238C, Carl Zeiss, Axiolab) és digitális fényképezőgépet (Nikon, Coolpix 4500) használtunk.

Szkenning elektromikroszkópos vizsgálatok

A transzformáns és nem transzformáns *A. nidulans* CS2902 csírázó konídiumainak morfológiai vizsgálatához 10^5 konídiumot 10 ml CM-tápoldatban 37 °C-on, 12 órán keresztül, folyamatos rázatással (160 rpm) tenyésztettünk. A csírázó konídiumokat előfixáló oldattal -20 °C-on, 16 órán keresztül tárgylemezre rögzítettük, utófixálás nélkül. A mintákat 50, 70, 80, 90 és 95 %-os etanollal, majd t-butanol-etanol különböző arányú elegyeivel kezeltük (1:2, 1:1, 2:1 arány, 1 h inkubáció minden esetben), végül 2×1 óra t-butanolos inkubációt követően 16 óra liofilizálással vízmentesítettük. Az alumínium tartókra kétoldalú szén ragasztószalaggal rögzítettük a mintákat, melyeket Hitachi S-4700 hideg-téremissziós pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltunk. A mintákat vákuumban, ~ 3 nm vékony Au-Pd (60/40 arány) réteggel fedtük be katódporlasztó berendezés (60 s, 18 mA; Quorum Technologies, SC 7620 'Mini' típus) segítségével. A mikroszkópozás során 5,0 kV gyorsító feszültséget alkalmaztunk, 10 mA mintaáram beállítással. A mintákat nagy- és kismagyítású (HM, LM) üzemmódban egyaránt vizsgáltuk, 1500-tól 63 010-ig terjedő nagyítást elérve.

5.5.4.7. Az egy- és kétértékű kationok hatásának vizsgálata a hNFAP antifungális aktivitására

Az egy- és kétértékű kationok hatását a hNFAP antifungális tulajdonságára 50 és 100 mM KCl-dal, Mg₂SO₄-tal, illetve Na₂SO₄-tal kiegészített 10⁵ konídium/ml-t tartalmazó 10 ml CM-tápoldatban vizsgáltuk. Az inkubáció 37 °C-on folyamatos rázatással (160 rpm) történt 7 napon át, majd a micéliumok száraztömegét centrifugálást (10 000×g, 30 perc) követő, 24 órán keresztül történő liofilizálás után mértük. Negatív kontrollként nem transzformáns *A. nidulans* CS2902 törzset használtunk. Minden kísérlethez 3 párhuzamos leoltást használtunk.

5.5.5. Az NFAP biológiai szerepének felderítésére használt módszerek

Az NFAP biológiai szerepének felderítéséhez előállítottunk egy *nfap* deléciós *N. fischeri* törzset. A $\Delta nfap$ törzs létrehozásához az NFAP-termelő *N. fischeri* NRRL 181 törzset egy lineáris deléciós konstrukcióval transzformáltuk (**4. Ábra**).

5.5.5.1. A $\Delta nfap$ *N. fischeri* NRRL 181 törzs előállítása

5.5.5.1.1. Lineáris deléciós konstrukció létrehozása

A konstrukció tartalmazza a *pyrithiamine* rezisztencia gént (*ptrA*), mely lehetővé teszi a transzformánsok szelekcióját a szelekciós ágenszt tartalmazó tápközegben. A *ptrA* gént a pSK275 plazmid hordozta.

A lineáris DNS-konstrukció szintézisének a *double-joint* PCR módszert alkalmaztuk (Yu és mtsai., 2004). A PCR-ben felhasznált reakcióelegy a következő volt:

1×*Phusion High Fidelity buffer* (Thermo Scientific; 1,5 mM MgCl₂-
0,2 mM dNTP mix (Thermo Scientific)
0,2 μM specifikus primer
5 pg templát DNS
1 U *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific)

A DNS-szakaszok amplifikálását *MJ Mini™ Personal Thermal Cycler*-ben (BIO-Rad) hajtottuk végre.

Double-joint PCR első reakció

Először az „A” („A” reakció), „B” („B” reakció) és „C” („C” reakció) amplikonok szintézisét hajtottuk végre (4. Ábra).

Az „A” (o5nfapNF és o5nfapAR1 indítószekvenciák) és „C” (o3nfapCF1 és o3nfapNR indítószekvenciák) amplikon esetén a következő reakciókörülményeket alkalmaztuk:

1 ciklus:	denaturálás	98 °C/2 perc
5 ciklus:	denaturálás	98 °C/20 másodperc
	indítószekvencia kötődés	65 °C-1°C/ciklus/15 másodperc
	láncszintézis	72 °C/2 perc
25 ciklus:	denaturálás	98 °C/20 másodperc
	indítószekvencia kötődés	52 °C/20 másodperc
	láncszintézis	72 °C/2 perc
1 ciklus:	végző láncszintézis	72 °C/7 perc

A „B” (onfapBF és onfapBR indítószekvenciák) amplikonszintézise során alkalmazott reakciókörülmények a következők voltak:

1 ciklus:	denaturálás	98 °C/1 perc
5 ciklus:	denaturálás	98 °C 20 másodperc
	indítószekvencia kötődés	65 °C-1°C/ciklus/15 másodperc
	láncszintézis	72 °C/2 perc
25 ciklus:	denaturálás	98 °C/20 másodperc
	indítószekvencia kötődés	60 °C/25 másodperc
	láncszintézis	72 °C/2 perc
1 ciklus:	végző láncszintézis	72 °C/7 perc

Double-joint PCR második reakció

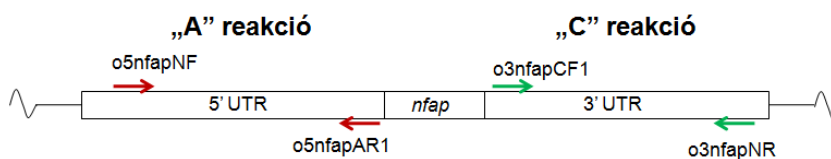
Az „A” és „C” reakció eredményeként kapott DNS szakaszokból (1810 és 1951 bp) a kimérákat tartalmazó „B” reakció terméke (2200 bp) segítségével, *nested* indítószekvenciák felhasználásával (DJforw és DJrev indítószekvenciák) szereltük össze a génkiütéshez szükséges lineáris DNS-konstrukciót (5913 bp) (4. Ábra).

A reakciókörülmények a következők voltak:

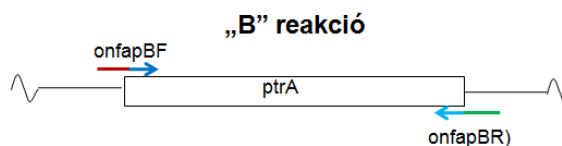
1 ciklus:	denaturálás	98 °C/1 perc
30 ciklus:	denaturálás	98 °C/20 másodperc
	indítószekvencia kötődés	57 °C/40 másodperc
	láncszintézis	72 °C/15 perc
1 ciklus:	végző láncszintézis	72 °C/7 perc

1. PCR:

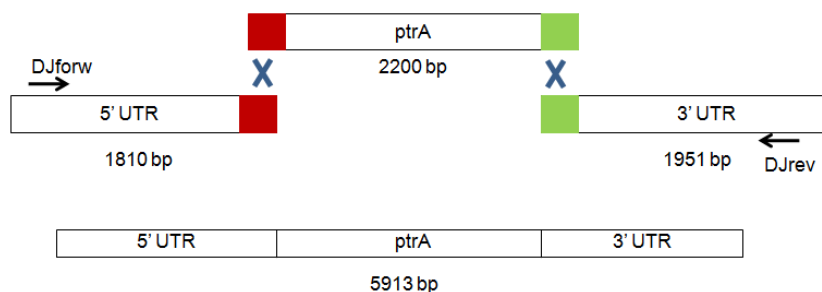
N. fischeri
gDNS



pSK275



2. PCR (nested):



4. Ábra. A lineáris deléciós konstrukt létrehozása során alkalmazott *double-joint* PCR folyamata.

5.5.5.1.2. A *N. fischeri* NRRL 181 transzformáció

A *N. fischeri* NRRL 181 törzs PEG-mediált transzformációját 5 µg lineáris deléciós konstrukció és 1×10^6 protoplaszt alkalmazásával az 5.5.4.2. fejezetben leírtak alapján, az alábbi módosításokkal végeztük el.

A *N. fischeri* NRRL 181 törzset MEA táptalajon, 25 °C-on neveltük. A transzformánsok szelekciójához *pyrithiamine*-tartalmú (0,4 µg/ml) MM-lemezeket használtunk, melyeket 30 °C-on inkubáltunk. A transzformálást követő napon a lemezekre

5 ml fedőagarréteget vittünk fel, ami csak a pozitív kontroll esetén nem tartalmazta a szelekciós ágenst. Az egy spórából kinövő pozitív klónokat *pyrithiamine*-t tartalmazó MM-táptalajra történő átoltással tovább szelektáltuk. A további kísérletekhez az így kapott, stabil klónokat használtuk.

A kontroll reakció esetében nem adtunk DNS-t a protoplasztokhoz; illetve a növekedési kontroll esetén *pyrithiamine*-mentes, míg a negatív kontroll esetén 0,4 µg/ml *pyrithiamine*-tartalmú tápközeget használtunk.

A *ptrA* gén sikeres beépülését DNS-kivonás után PCR-technikával, a genom egy szakaszának amplifikációjával (o5nfapA1 és o3nfapA2 indítószekvenciák) ellenőriztük. A reakció elegye megegyezett az 5.5.5.1. fejezetben leírtakkal.

Az alkalmazott reakciókörülmények a következők voltak:

1 ciklus:	denaturálás	98 °C/1 perc
30 ciklus:	denaturálás	98 °C/20 másodperc
	indítószekvencia kötődés	56 °C/17 másodperc
	láncszintézis	72 °C/6 perc 30 másodperc
1 ciklus:	végző láncszintézis	72 °C/10 perc

5.5.5.1.3. DNS-blottolás és hibridizálás

A deléciós konstrukció helyspecifikus beépülésének meghatározásához Southern-hibridizációt használtunk.

Génpróbák szintézise

A hibridizációs kísérletekhez digoxigenin-jelölt (DIG-11-dUTP felhasználásával) génpróbákat a *DIG Probe Synthesis Kit* (Roche) segítségével állítottuk elő a gyártó utasításai alapján.

Az *nfap* próba szintézisének (nfAnestF és nfCnestR indítószekvenciák) PCR-körülményei a következők voltak:

1 ciklus:	denaturálás	98 °C/1 perc
30 ciklus:	denaturálás	98 °C/20 másodperc
	indítószekvencia kötődés	66 °C/15 másodperc
	láncszintézis	72 °C/30 másodperc
1 ciklus:	végző láncszintézis	72 °C/7 perc

A *ptrA* próba szintézisének (optrA2.1 és optrA1 indítószekvenciák) PCR-körülményei a következők voltak:

1 ciklus:	denaturálás	98 °C/1 perc
30 ciklus:	denaturálás	98 °C/ 20 másodperc
	indítószekvencia kötődés	53 °C/ 15 másodperc
	láncszintézis	72 °C/ 30 másodperc
1 ciklus:	végző láncszintézis	72 °C/ 7 perc

DNS-blottolás

A DNS-blottolást megelőzően a *N. fischeri* NRRL 181 és transzformáns törzsek genomi DNS-ét *EcoRV* restrikciós endonukleázzal emésztettük, a pSK275 plazmidot (ami a *pyrithiamine* rezisztencia gént tartalmazza) *HindIII* restrikciós endonukleázzal linearizáltuk az alábbi elegyekben 37 °C-on 16 órán keresztül:

50 µl DNS-kivonat (10 µg)	1 µl pSK275 (0,5 µg)
20 µl reakciópuffer (Red, Thermo Scientific)	1 µl reakciópuffer (Red, Thermo Scientific)
4 µl <i>EcoRV</i> (Thermo Scientific)	1 µl <i>HindIII</i> (Thermo Scientific)
126 µl desztillált víz	7 µl desztillált víz

Az emésztett mintákat 200 µl izopropanollal (100%) kicsaptuk, a csapadékot lecentrifugáltuk (13 000×g, 25 perc), 70%-os etanollal mostuk, beszárítottuk, majd 15 µl desztillált vízben oldottuk fel. A különböző méretű DNS-szakaszokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el egymástól. Negatív kontrollként a vad típus *EcoRV* emésztett genomi DNS kivonatát, pozitív kontrollként linearizált pSK275 plazmidot használtunk. Az elektroforézist követően a gélt 20 percen át depurináló oldattal kezeltük, majd desztillált vizes mosás után 30 percig denaturáló oldatban, végül 30 percen át neutralizáló oldatban inkubáltuk. Ezt követően 16 órán keresztül 20x SSC oldat segítségével blottoltuk a hibridizációs membránra (Hybond-N+, Fluka), melyre a DNS-t 2 percen keresztül UV fény segítségével rögzítettük.

Hibridizálás

A hibridizációs membránt 65 °C-on egy órán keresztül hibridizációs pufferrel előhibridizáltuk, majd 65 illetve 72 °C-on, jelölt próbát tartalmazó hibridizációs oldattal (30 ng/ml) hibridizáltunk 16 órán keresztül. A jelölt próbát minden esetben a felhasználást megelőzően 10 percig 100 °C-on denaturáltuk. A hibridizációs membránt szobahőmérsékleten kétszer 5 percig az 1. mosó oldattal, majd kétszer 15 percig 65 °C-on a 2. mosó oldattal kezeltük. Ezt követően az 1. detektáló pufferrel 2 percig, majd a 2. detektáló pufferrel 30 percig, végül a 2. detektáló pufferhez adott 9 µl alkalikus foszfát antitest-konjugátummal (*Anti-Digoxigenin-AP*, Roche) újabb 30 percig inkubáltuk. Ezt követően a membránt kétszer 15 percig az 1. detektáló pufferrel, majd 2 percig a 3. detektáló pufferrel mostuk. A detektálást a 3. detektáló pufferhez adott 200 µl NBT-BCIP (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche) előhívó reagenssel végeztük sötétben történő inkubációval 4 órán keresztül. A felesleges festéket desztillált vizes mosással távolítottuk el.

5.5.5.2. A vad típusú és a $\Delta nfaP$ mutáns *N. fischeri* NRRL 181 növekedésének vizsgálata

A vizsgálat során MM és CM táptalajokra leoltott, vad típusú és $\Delta nfaP$ mutáns *N. fischeri* NRRL 181 növekedését vizsgáltuk.

A növekedés vizsgálatához vad típusú és $\Delta nfaP$ mutáns *N. fischeri* NRRL 181 törzset masszívan oltottunk (1 ml 10^5 spóra/ml) CM és MM táptalajokra, melyeket 48 óráig, 25 °C-on inkubáltunk. A teszt során a tenyészetekből dugófúróval agarkorongokat készítettünk, majd a megfelelő táptalajra a micéliumot hordozó résszel lefelé 3-3 darabot, egymástól egyenlő távolságra elhelyeztünk. A csészéket 25 °C-on inkubáltuk és 24 óránként egy héten át mértük a fejlődő telepek átmérőjét.

5.5.5.3. A vad típusú és a $\Delta nfaP$ mutáns *N. fischeri* NRRL 181 *in vitro* antagonizmusának vizsgálata

Az *in vitro* antagonizmus teszt

Az *in vitro* antagonizmusra való képesség vizsgálatához a korábban, Szekeres és mtsai. (2006) által leírt módszer módosított változatát használtuk. A vizsgálat során MM és CM táptalajokra leoltott, vad típusú és $\Delta nfaP$ mutáns *N. fischeri* NRRL 181 növekedését

vizsgáltuk kompetitor mikroorganizmusként szóba jöhető 10 járomspórás- és 11 tömlősgomba izolátummal szemben.

Az *in vitro* antagonizmus-teszthez előzetesen az 5.5.5.2. fejezetben ismertetett módon CM vagy MM táptalajra masszívan oltott (10^5 spóra/ml) tenyészeteket használtunk. Az 5.5.5.2. fejezetben tárgyalt vizsgálathoz hasonlóan a tenyészetekből dugófúróval készített agarkorongokat a micéliumot hordozó résszel lefelé helyeztük a megfelelő, Petri-csészébe öntött táptalajokra, a csésze középpontjától 1,5 cm távolságra. Első lépésben a *N. fischeri* NRRL 181 vad és Δnfa mutánsból kivágott korongokkal oltottunk le, majd 24 óra elteltével a kompetitor izolátumokból kivágott korongokat helyeztük a táptalajra. Az így leoltott, egymástól 3 cm távolságra elhelyezkedő telepeket 25 vagy 37 °C-on (*Rhizomucor miehei*) inkubáltuk és 24 óránként vizsgáltuk a telepmorfológiát és a kialakuló gátlási zónát. Minden csészéről 24 óránként digitális fényképezőgéppel fotót készítettünk.

A vizsgálatokat három párhuzamos bevonásával végeztük el.

Az *in vitro* antagonizmus-teszt kiértékelése

Az *in vitro* antagonizmus folyamatát a csészéről egy 32 cm-re beállított állványra rögzített digitális fényképezőgéppel (Canon Power Shot A520) készített fotók segítségével követtük nyomon. Az eredeti, 2272x1704 pixeles képeket az *Irfan View* v3.95 szoftver (Irfan Skiljan, Graduate of Vienna University of Technology, 1996-2011) által használt Lanczos szűrő átméretező módszerének segítségével azonos méretűre alakítottuk (Duchon, 1979). A digitális képeken a *Scion Image* v4.02 szoftver (Scion Corporation) segítségével, szabad kézzel történő körberajzolás után megmértük a *Neosartorya* törzs, a kompetitor izolátum, illetve a kettő által elfoglalt terület nagyságát. A kiértékelés során a skálát 28,346 pixel/cm-re állítottuk, ennek megfelelően a lemért területeket cm²-ben kaptuk meg. A vizsgált *Neosartorya* törzsek *in vitro* antagonizmusra való képességét az *in vitro* antagonizmus index-szel (IVAI) jellemeztük, amit a következő képlet segítségével számoltunk ki Szekeres és munkatársai (2006) alapján:

$$IVAI = (Neosartorya \text{ törzs területe} / Neosartorya \text{ törzs} + a \text{ kompetitor izolátum területe}) \times 100.$$

A *Neosartorya* törzsek és a kompetítor gombaizolátum között kialakuló gátlási kölcsönhatás minőségi értékelésére az alábbi jelöléseket vezettük be:

Pozitív hatás (+): *N. fischeri* visszaszorítja a másik gomba növekedését, közöttük gátlási zóna alakul ki, a másik gombafaj telepszéle homorú morfológiát mutat, vagy a *N. fischeri* ránő.

Negatív hatás (-): A *N. fischeri* növekedése gátlódik, telepszéle homorú morfológiát mutat, vagy a másik izolátum ránő.

Semleges hatás (0): Nincs kölcsönhatás a két gombafaj között, nem alakul ki gátlási zóna, a telepek összeérnek, egymással szembe eső telepszéleik egyenletes növekedésűek.

5.5.6. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai analízisét *GraphPad Prism* (v 5.01 for Windows, GraphPad Software) programmal végeztük. A szignifikancia megállapításához a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analízisét használtuk.

6. Eredmények és értékelés

6.1. Az *nfap* izolálása

Az általunk vizsgált *N. fischeri* NRRL 181 izolátum PAF klasztert hordozó defenzinszerű proteint kódoló génre való szűrésének alapja az NCBI adatbázisában megtalálható, feltételezett NFAP-t kódoló gén (GeneID: 4589416) volt. PCR segítségével sikerült egy, az *nfap*-t és annak határoló régióit tartalmazó 1954 bp hosszúságú DNS-szakaszt amplifikálnunk. A PCR-termék nukleotidsorrendjének a meghatározása után a 409 bp hosszúságú *nfap* DNS-szekvenciát a GenBank nemzetközi adatbázisban helyeztük el (GenBank ID: AM983570.1). A szekvencia 100% homológiát mutatott a *N. fischeri* genomi adatbázisban megtalálható, hipotetikus antifungális fehérjét kódoló génnel (NCBI ID: XP_001262586). A cDNS-szekvencia vizsgálata alapján az *nfap* két intront tartalmaz a 128-190. és 277-337. pozíciókban, és feltételezhetően egy 94 aminosavból álló prekursor proteint kódol (**5. A Ábra**).

Az *nfap* promóter analízise során számos olyan szabályozó elemet azonosítottunk, melyek feltételezhetően részt vesznek a gén transzkripciójának regulációjában. (**5. A és B Ábra**). Az eukarióta gének transzkripciójának iniciációjában szerepet játszó TATA box és hét, konszenzus CAAT-box (HAP-szerű komplex kötőhelyek, amelyek elősegítik és erősítik a transzkripciót) mellett egy stresszhatásokra és környezeti szignálokra termelődő fehérje kötőhelyét is azonosítottuk (HGATAR-box) (Ballance, 1986, Ko és Engel, 1993). A két HGATAR-box a GATA-faktor kötőhelyeként szolgál. A GATA-faktorok környezeti ingerekre termelődnek és a cirkadián ritmust, vasmetabolizmust és szexuális fejlődést szabályozzák, továbbá részt vehetnek a szénéhezés, a nagy mennyiségű nátrium-klorid vagy etanol jelenléte és a hő okozta stressz hatására létrejövő expressziós mintázat kialakításában (Marx, 2004).

Kísérleteink során egy új, a fonalgombák defenziszerű fehérjéivel homológ gén jelenlétét mutattuk ki *N. fischeri* (NRRL 181) izolátumból. Az *nfap* promóter régiójában - a szakirodalomban leírt homológ fehérjékéhez hasonlóan - külső környezeti szignálokra és stresszhatásra termelődő transzkripciós faktorok kötőhelyeit azonosítottuk (Marx, 2004; Meyer, 2008).

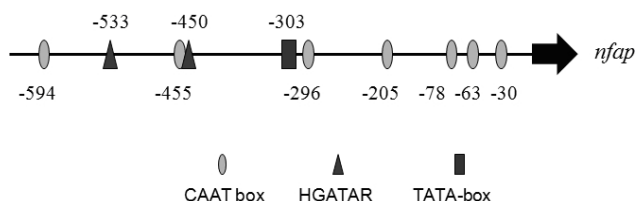
A.

```

-823 catcgcccacaaaacatgggttatatattataggcagttttacatttaagtccttgaacaaatggcacgaagtcacaaaccagga
-740 cactagcctaaagacaggggacagaaacaggattcgggaatggagggtagaatatatcctgacagagccgactgggaatatcag
-657 gaaacaggggctgctgctcaaaaggtcctgtactattgtagtgtctacaggttgtgagaat[caat]gcgagcatgagtagttggga
-574 agatgctaagtggatatgagtactagaatgcaagaagataaaatatcctgaattctttaagagacatgggtcgggaacgggatt
-491 aagcccaaatcttatccttcctcctcctaggg[caat]gataaatatgtcactacctctaccctgcatgcctaataatgcactcatgtc
-408 ttggatctgaaaatcattcctcatttcagcatgccagaaaaatctaactggctgatctgttactctggtcgttctcgcacatgtta
-325 tcactcctgcacatgggtataat[caat]gagtcacaaatgctcgccataggattataccaaccaacaaactgaatatcttcaa
-242 ctacgtaaattagagctctattgggttagctcaa[caat]ccttcggctcgggcacccatgatgactgcctccaaattggtgatca
-159 tgtttgtcacctcttctacagggatcaggatgattcctacataagacagctcctcaacgcctaatttacaagata[caat]ct
1 M Q
-77 catcaagac[caat]ctgtctatgattatgtgatccatctt[caat]tgtctcaaccaacgctccaagcccttcaccATGCAG
3 I T K I S L F L F V G I G V V A S P I H A * E S D G L N A
7 ATCACTAAGATTTCCTTTTCCTGTTGGCATAGGTGTGGTTGCTAGTCCCATTCATGCCGAGTCTGACGGCCTCAATGC
31 R A V N A A D L E Y K G E
90 TAGAGCCGTGAATGCTGCCGACCTTGAGTATAAAGGAGTgagatttatacaatatctgcccacataaaactaaaactaagtac
44 C F T K D N T C K Y K I D G K T Y L A K C
173 tcataacaactcccaggAATGTTTACAAAGGACAACACTTGTAAATACAAAATTGATGGGAAGACATACCTTGCCAAGTGC
65 P S A A N T K C
256 CCTAGCGCCGCCAACACAAAGgtatcttttctttatacttaagtatattgccctcggctaaccatgataattatcttttaagT
73 E K D G N K C T Y D S Y N R K V K C D F R H ***
339 GCGAGAAGGATGGAAATAAGTGCACATATGACTCCTACAACAGAAAGGTCAAGTGTGACTTCCGCCATTGAtaaaactatttc
422 aaatggctgttctctggccattcttcttaccaggaagtgtgagatgcccgtgattctcaatactcacaattcgccttcaagaag
505 ggtaggaacaaacaatataggatgtatgttgggttgatacatatgtgatgtgcacccccagtagtcttggcttttctgtgattt
588 ttgctacgaccacactcgttttagtatctagcttagatgttttgccttcaacaaattacttattgactacctgatattttgagc
671 atctctatcattcagagaatatcctagccatctatttattgctgagttatgctagtagcctgatgctctagtagctaccatgt
754 ttttcacgaatctgacccgagggattgtctctgacagtttgaacaatccagcagttcaacaattaccagaactccgaacatat
837 gtatttcatctgaatcatgtaagtagtgtaattgtatcttatttgtacaccttagaagatagagcagatatgcgaagggctgc
920 attaggagagaagagtaacattgaactcggaaactaaagtaggagataagctaagaaaggagagagatctgattgacatct
1003 tccttaacatctgctttggggccttctcgcgtcttactattttacgccatcctttgagtcaccttcaagtcctttattct
1086 ccgtagcttcagtagcttcaactcttcaaaaagactcttcaggcgaagca

```

B.



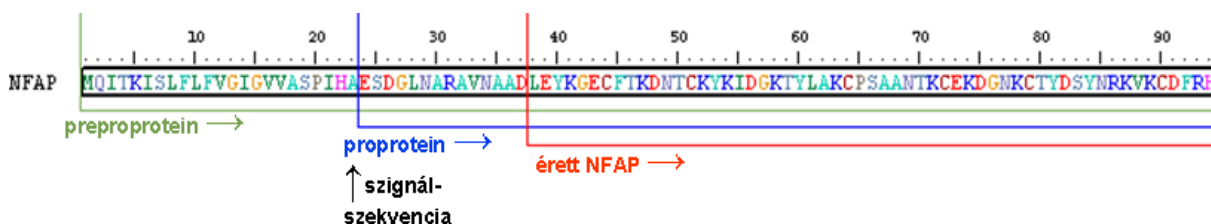
5. Ábra. (A) Az *nfap*, valamint 5' és 3' határoló régióinak nukleotidsorrendje. Az 1-23. aminosavat kódoló triplet régió feltételezhetően egy szignálszekvencia, melynek lehasadási helyét egy csillag; az így létrejövő proproteinről az érési folyamat során lehasadó további aminosavakat kódoló triplet régiót két csillag jelöli. A TATA-szekvenciát szaggatott vonalú keret, a feltételezett HAP-szerű komplex kötőhelyét (CAAT-box) folyamatos vonalú keret, a vélt GATA-faktor kötőhelyeit aláhúzás jelöli. A stopkodont három csillag, a nem kódoló szekvenciákat kisbetű jelöli. A szürkével kiemelt nukleotidok a gén amplifikálása során használt indítószekvenciák kötőhelyeit jelölik. (B) Az azonosított transzkripció szabályozó elemek az *nfap* gén promóter régiójában.

6.2. *In silico* vizsgálatok

Az érett NFAP fizikai és kémiai tulajdonságainak vizsgálatához, valamint a szignálszekvencia és az érett fehérje harmadlagos szerkezetének előrejelzéséhez *in silico* vizsgálatokat végeztünk.

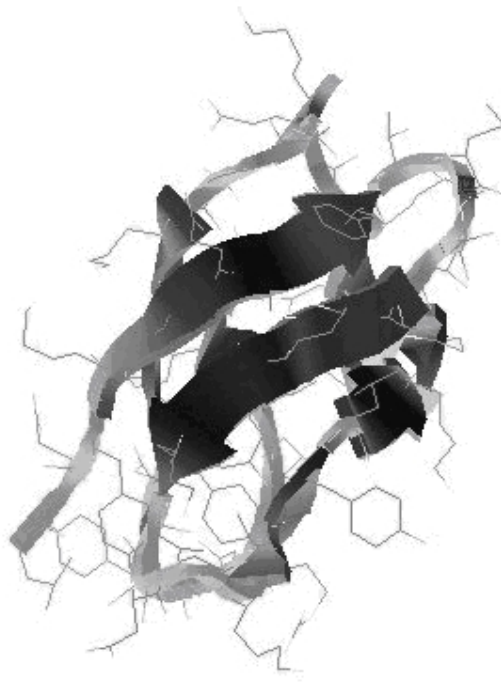
Vizsgálataink alapján kimutattuk, hogy a sejtből történő kijutása során az NFAP egy érési folyamaton megy keresztül. A fehérje N-terminális végéről egy 23 aminosav hosszúságú extracelluláris szignálszekvencia, majd további 14 aminosav hasad le (**5. A és 6. Ábra**). Az előre jelzett, érett NFAP kisméretű, bázikus fehérje: 57 aminosav hosszúságú, 6625,5 Da molekulatömegű, izoelektromos pontja 8,93. A fehérje két doménből áll, amit az 1-24. és 25-57. aminosavak alakítanak ki. Az NFAP szerkezetét három diszulfid-híd stabilizálja, amelyek a 7. és 14., a 27. és 42., és a 35. és 53. pozíciójú ciszteinek között jönnek létre.

Az érett fehérje aminosavsorrendje 10,3%, 12%, 17,5%, 19,2% és 22,8% homológiát mutat a szakirodalomban korábban leírt ANAFP, PgAFP, AFP-ACLA, PAF-NAF és FPAFP PAF-klasztart tartalmazó defenzinszerű proteinekével (**1. Ábra**).



6. Ábra. Az a NFAP érése során feltételezett változások.

A homológia modellezéssel előállított harmadlagos NFAP szerkezeti kép alapján a fehérje harmadlagos szerkezete nagyon hasonló a β -defenzinszerű molekulákéhoz: 5 β -lemez hurokrégiókkal összekapcsolva (**7. Ábra**) (White és mtsai., 1995; Thomma és mtsai., 2002; Korneva és mtsai., 2003).



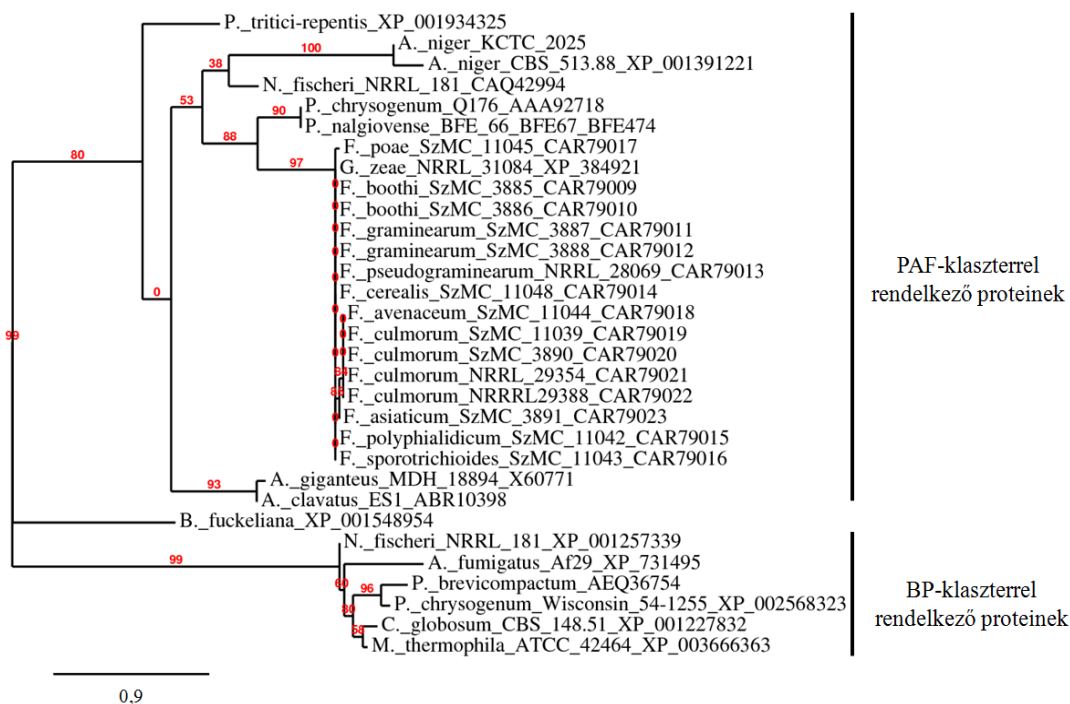
7. Ábra. Az érett NFAP feltételezett harmadlagos szerkezete (homológia modell, SWISS-MODEL; Arnold és mtsai., 2006).

Az *in silico* vizsgálatok eredményeként az NFAP egy ~6,6 kDa tömegű, bázikus, a defenzinekéhez hasonló harmadlagos szerkezetű protein, amit három diszulfid-híd stabilizál. Ezek az előrejelzett tulajdonságok hasonlóak a szakirodalomban korábban leírt PAF-klasztert tartalmazó defenzinszerű proteinek jellemzőihez (Marx, 2004). *In silico* vizsgálataink alapján az NFAP az AFP-hez, a PAF-hoz, az ACLA-hoz és a PgAFP-hez hasonlóan preproprotein formájában expresszálódik. Az NFAP aminosavszekvenciája eltér a szakirodalomban eddig leírt defenzinszerű antifungális fehérjék aminosavsorrendjétől, de a ciszteineket határoló aminosav régiók nagymértékű hasonlóságot mutatnak a többiéhez. Ezek a feltételezések szerint valószínűleg fontos szerepet töltenek be az antifungálisan aktív fehérjeszerkezet kialakításában (**1. Ábra**, Marx, 2004; Meyer, 2008; Batta és mtsai., 2009).

6.3. Az NFAP filogenetikai analízise

Az NFAP filogenetikai kapcsolatainak vizsgálatához a fonalas tömlősgombák által termelt, a dolgozat elkészítéséig már izolált vagy feltételezett defenzinszerű proteinek aminosavszekvenciáit használtuk fel.

Eredményeink megerősítik a Bevezetés c. fejezetben tárgyalt feltételezést, amely szerint a fonalas tömlősgombák által termelt, defenzinszerű antifungális proteinek két nagy csoportot alkotnak: a PAF-klaszterrel rendelkező proteinek és a BP-klaszterrel rendelkező proteinek csoportját. Vizsgálataink alapján a *B. fuckeliana* által termelt protein egy új csoportot képvisel. Az NFAP-re vonatkozóan a filogenetikai vizsgálatunk eredményeként megállapíthatjuk, hogy a PAF-tól és az *A. niger* által termelt ANAFP-tól elkülönülő, AFP-rokon kládban helyezkedik el (8. Ábra).



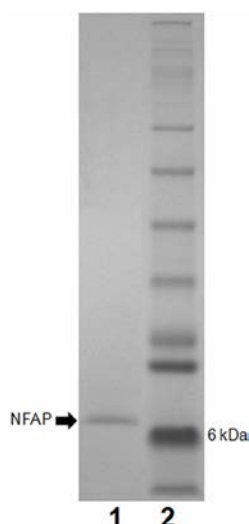
8. Ábra. Az izolált és feltételezett Ascomycota eredetű defenzinszerű proteinek szekvenciáján alapuló filogenetikai fa. A fajnév után a törzsgyűjteménybeli számot, és a protein adatbázisban regisztrált számát tüntettük fel (amennyiben az információ rendelkezésre áll).

6.4. Az NFAP izolálása

Az NFAP antimikrobiális tulajdonságainak vizsgálatához elengedhetetlen volt a tiszta protein nagy mennyiségben történő előállítása.

Az *nfap* promóter régiójában olyan szekvenciamotívumokat mutattunk ki, amelyek külső környezeti hatásokra és eltérő stresszkörülményekre termelődő fehérjék kötőhelyeit jelentik. Ezek figyelembevételével az NFAP termelődését elősegítő tápközeg összetételét úgy határoztuk meg, hogy az stresszkörülményt jelentsen a gomba számára. Erre a célra szolgált a tápközegekben a keményítő, a NaCl és az etanol jelenléte. A keményítő egy nehezebben hasznosítható szénforrást jelent a gomba számára, így az éhezést indukál. A viszonylag magas sókoncentráció és az alkohol membránszerkezet zavaró hatása is stresszfaktorként jöhet szóba. Az NFAP termelésére szolgáló tápközeg kidolgozásának alapját a szakirodalomban már korábban leírt, hasonló fehérje termelését serkentő tápközegek összetevők adták (Marx, 2004).

Vizsgálataink során sikerült optimalizálnunk az NFAP termelődését elősegítő tápközeget. A legnagyobb mértékű antimikrobiális hatást a 0,5% NaCl és 1% etanol tartalmú AFPIM tápoldatban nevelt *N. fischeri* NRRL 181 rázatott tenyészet (168 óra, 25 °C-on, 220 rpm) fermentlevénél mértük *A. niger*-rel (SZMC 601) szemben agardiffúziós lyuktesztben (nem közölt adat). A fermentlé kromatográfiás módszerrel történő tisztítása utáni, antifungálisan aktív frakciókból gélelektroforézissel sikerült egy kisméretű (~6,6 kDa) fehérjét kimutatnunk (**9. Ábra**). A proteint *N. fischeri* antifungális proteinnek (NFAP, EMBL ID: CAQ42994) neveztük el. A fehérje első hat aminosavát N-terminális szekvenálással azonosítottuk (LEYKGE), ami megfelelt az érett NFAP *in silico* előrejelzett első hat aminosavának (**6. Ábra**). 1000 ml fermentléből 1250±123 µg NFAP-t sikerült tisztítanunk az általunk alkalmazott módszerrel.



9. Ábra. A fehérjetisztítás után antifungálisan aktívnak mutakozó frakciók fehérjetartalma 4-12% Bis-Tris SDS PAGE-en, Coomassie-kék festés után 1. *Neosartorya fischeri* NRRL 181 antifungális protein, 2. *SeeBlue Plus2* (Thermo Scientific).

Az AFP és PAF esetében bizonyították, hogy a tápanyag korlátozása, illetve a különböző típusú stresszörülmények növelik a kódoló génjeik expresszióját (Marx, 2004). Hozzájuk hasonlóan az *nfap* gén 5' promóter régiójában is több olyan stressz-válaszelem található, amelyek környezeti hatásokra aktiválódnak (Marx, 2004). Az ezek figyelembevételével optimalizált tápközegeben a *N. fischeri* NRRL 181 viszonylag csak kis mennyiségben termelte meg a fehérjét, azonban ez a mennyiség összevethető az AFP és a PAF tisztítása során elért, a szakirodalomban megtalálható adatokkal (Marx, 2004).

6.5. Az NFAP antifungális tulajdonságai

Előzetes vizsgálataink alapján a tisztított NFAP nem gátolta Gram-pozitív (*Bacillus subtilis* SZMC 0209, *M. luteus* SZMC 0197), Gram-negatív (*E. coli* SZMC 1304, *Serratia marcescens* SZMC 0567) baktériumok és élesztőgombák (*C. albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* CBS 573, *S. cerevisiae* SZMC 0644) növekedését sem agardiffúziós, sem mikrodilúciós tesztben. Ezért a továbbiakban az antimikrobiális hatást fonalgombákkal szemben vizsgáltuk mikrodilúciós tesztben.

A vizsgálatba öt járomspórás és öt tömlősgomba-izolátumot vontunk be: *Absidia corymbifera* (SZMC 95033), *Mortierella wolffii* (CBS651.93), *M. piriformis* (SZMC 12078), *R. miehei* (CBS 360.92), *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* (CBS

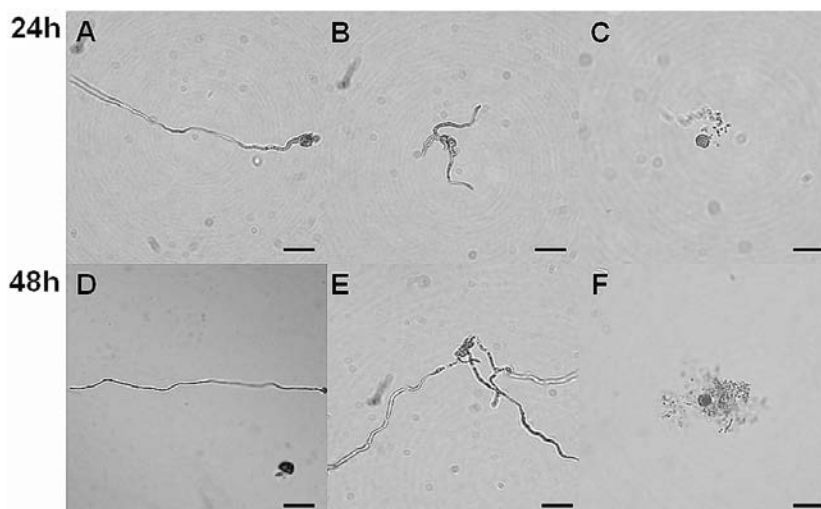
102.277), *A. nidulans* (SZMC 0307), *A. niger* (SZMC 601), *B. cinerea* (NCAIM F00751), *Fusarium graminearum* (SZMC 11030), *Trichoderma longibrachiatum* (UAMH 7955). Az NFAP az alkalmazott koncentráció-tartományban (12,5-200 µg/ml) két Ascomycota (*A. niger* és *A. nidulans*) és egy Zygomycota (*R. miehei*) izolátum növekedését gátolta hatékonyan, dóziszfüggő módon (**5. Táblázat**). Legérzékenyebbnek az *A. niger* mutatkozott: A 200 µg/ml NFAP teljes növekedésgátlást eredményezett még 48 h elteltével is, és még a 12,5 µg/ml NFAP is hatékonynak bizonyult (32±5% növekedésgátlás). Az NFAP MIC₅₀-értékei (50%-os növekedésgátlást okozó koncentráció) az *A. nidulans* esetén 200 µg/ml volt 48 h inkubáció után. Ez az érték az *A. niger* esetén 25, illetve 100 µg/ml volt 48 h és 72 h inkubáció után (**5. Táblázat**). A *R. miehei* esetében az alkalmazott NFAP koncentrációtartományban MIC₅₀-értéket nem tudtunk megállapítani. Az NFAP az antifungális aktivitását 96 óra inkubáció után is megtartotta. Az *A. corymbifera*, a *B. cinerea*, a *F. graminearum*, a *M. wolfii*, a *M. piriformis*, a *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* és a *T. longibrachiatum* az általunk alkalmazott *in vitro* tesztekben rezisztensnek bizonyultak.

5. Táblázat. Különböző koncentrációjú NFAP jelenlétében mért növekedési százalékok.

NFAP (µg/ml)	200	100	50	25	12,5	0 (kontroll)
Tömlősgomba						
<i>Aspergillus nidulans</i> SZMC 0307						
48h	42(±4,5)% ***	66(±3,9)% ***	76(±5,3)% ***	85(±2,7)% ***	93(±1,3)% ^{nsz}	100%
72h	77(±3,2)% ***	85(±3,4)% ***	100%	100%	100%	100%
<i>Aspergillus niger</i> SZMC 601						
48h	0% ***	18(±5,2)% ***	40(±1,5)% ***	52(±1,7)% ***	68(±5,4)% ***	100%
72h	32(±5,0)% ***	44(±3,3)% ***	70(±3,6)% ***	76(±4,8)% ***	88(±5,9)% *	100%
Járomspórás gomba						
<i>Rhizomucor miehei</i> CBS 360.92						
24h	76(±1,5)% ***	85(±2,0)% ***	93(±3,6)% **	100%	100%	100%
48h	78(±6,7)% ***	88(±4,9)% **	100%	100%	100%	100%
72h	85(±5,7)% ***	91(±1,3)% **	100%	100%	100%	100%

A kezeletlen kontroll növekedését tekintettük 100%-nak. A zárójelben feltüntetett számok a szórást jelentik (N=3). A szignifikancia értékeket (p-értékek) a kezeletlen kontrollokhoz (0 µg/ml NFAP) viszonyítva határoztuk meg. ***: p<0,0001, **: p<0,005, *: p<0,05, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség.

100 $\mu\text{g/ml}$ NFAP jelenlétében az *A. niger* konídiumaiból fejlődő csíratömlők később jelentek meg, illetve a képződő hifák rövidek, elhajlóak, többszörösen elágazóak és duzzadt végűek voltak a kezeletlen kontrollhoz képest (0 $\mu\text{g/ml}$ NFAP). A 200 $\mu\text{g/ml}$ NFAP már 24 óra inkubáció után is a fejlődő csíratömlő szétesését okozta (**10. Ábra**).



10. Ábra. Az *Aspergillus niger* SZMC 601 konídiumainak csírázása 100 $\mu\text{g/ml}$ (**B, E**) és 200 $\mu\text{g/ml}$ (**C, F**) NFAP jelenlétében a kezeletlen kontrollokhoz (**A, D**; 0 $\mu\text{g/ml}$) viszonyítva 24 (**A-C**) és 48 óra (**C-F**), 25 °C-on történt inkubáció után. Az egységek hossza 20 μm (**A-C, E, F**) és 10 μm (**D**).

Vizsgáltuk a 200 $\mu\text{g/ml}$ NFAP antifungális hatását eltérő hőmérsékleten történő 30 perces hőkezelés után, különböző pH-értékeken, illetve eltérő koncentrációjú proteináz K kezelés után *A. niger*-rel szemben. Az NFAP a legnagyobb mértékű antifungális aktivitást 8,4 és 8,6 közötti pH-értékeken mutatta, de az antifungális hatását a többi vizsgált pH-értéken is különböző mértékig megtartotta (**6. Táblázat**). A fehérje stabilnak bizonyult még 30 perc 100 °C-os hőkezelést követően is (**7. Táblázat**), továbbá, a kezelt NFAP hatékonyan gátolta az *A. niger* növekedését 120 óra, 25 °C-on történő inkubáció után. Az NFAP antifungális hatása megmaradt különböző koncentrációjú (1,25; 2,5; 5 és 10 mg/ml) proteináz K kezelés (30 °C, 16 h) után is *A. niger*-rel szemben (**11. Ábra**). A hatás még 120 óra, 25°C-on történő inkubáció után is megfigyelhető volt (**8. Táblázat**). Negatív kontrollként használt NFAP-mentes, proteináz K jelenlétében gátlási zónák nem jelentek meg.

6. Táblázat. Az *Aspergillus niger* SZMC 601 hifanövekedésének gátlása különböző pH-értékeken 200 µg/ml NFAP jelenlétében.

pH	Gátlási zóna átmérője (mm)			
	48 h	72 h	96 h	120 h
7,0	16,67 (±1,53) ***	15,33 (±0,58) ***	12,00 (±2,65) ***	12,00 (±2,60) ***
7,2	18,00 (±3,00) **	15,67 (±1,15) ***	15,00 (±2,00) **	14,67 (±1,53) **
7,4	20,67 (±2,08) ^{nsz}	17,33 (±1,53) *	17,33 (±1,53) ^{nsz}	17,00 (±1,00) ^{nsz}
7,6	21,33 (±2,08) ^{nsz}	18,00 (±1,73) ^{nsz}	17,67 (±1,15) ^{nsz}	17,67 (±1,15) ^{nsz}
7,8	21,67 (±0,58) ^{nsz}	18,33 (±0,58) ^{nsz}	17,33 (±1,15) ^{nsz}	17,67 (±1,53) ^{nsz}
8,0	23,00 (±3,00) ^{nsz}	18,67 (±1,15) ^{nsz}	18,00 (±1,00) ^{nsz}	17,33 (±0,58) ^{nsz}
8,2	23,00 (±0,00) ^{nsz}	19,67 (±0,58) ^{nsz}	19,00 (±1,00) ^{nsz}	18,33 (±0,58) ^{nsz}
8,4 (kontroll)	24,33 (±0,58) ^{nsz}	20,33 (±0,58) ^{nsz}	19,67 (±0,58) ^{nsz}	19,33 (±0,56) ^{nsz}
8,6	24,17 (±0,76) ^{nsz}	20,67 (±0,58) ^{nsz}	20,00 (±1,00) ^{nsz}	19,67 (±1,15) ^{nsz}
8,8	23,50 (±0,50) ^{nsz}	19,67 (±0,58) ^{nsz}	19,00 (±1,00) ^{nsz}	18,67 (±0,58) ^{nsz}
9,0	23,33 (±1,15) ^{nsz}	19,00 (±1,73) ^{nsz}	18,67 (±1,53) ^{nsz}	18,67 (±1,73) ^{nsz}

A zárójelben feltüntetett számok a szórást jelentik (N=3). A szignifikancia értékeket (p-értékek) a pH 8,4-en kezelt mintához viszonyítva határoztuk meg. ***: p<0,0001, **: p<0,005, *: p<0,05, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség.

7. Táblázat. Az *Aspergillus niger* SZMC 601 hifanövekedésének gátlása eltérő hőmérsékleti értékeken, 30 percig kezelt, 200 µg/ml NFAP jelenlétében.

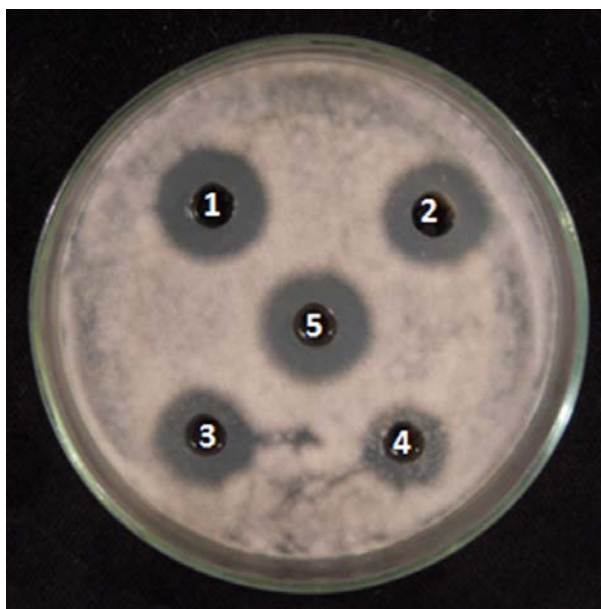
Hőmérséklet	Gátlási zóna átmérője (mm)			
	48 h	72 h	96 h	120 h
30 °C	21,00 (±0,58) ^{nsz}	18,00 (±0,58) ^{nsz}	17,50 (±1,73) ^{nsz}	17,50 (±1,15) ^{nsz}
40 °C	21,33 (±1,15) ^{nsz}	17,33 (±1,73) ^{nsz}	17,17 (±0,58) ^{nsz}	17,00 (±1,00) ^{nsz}
50 °C	21,00 (±1,53) ^{nsz}	16,50 (±1,53) ^{nsz}	16,40 (±2,00) ^{nsz}	16,50 (±1,15) ^{nsz}
60 °C	22,00 (±1,73) ^{nsz}	17,00 (±1,00) ^{nsz}	17,33 (±1,53) ^{nsz}	17,00 (±1,53) ^{nsz}
70 °C	21,67 (±0,58) ^{nsz}	17,50 (±1,15) ^{nsz}	17,50 (±1,15) ^{nsz}	17,67 (±1,00) ^{nsz}
80 °C	19,33 (±1,15) *	17,50 (±1,73) ^{nsz}	17,50 (±0,58) ^{nsz}	17,00 (±0,58) ^{nsz}
90 °C	18,00 (±0,58) ***	16,00 (±0,58) **	16,33 (±0,76) ^{nsz}	16,17 (±0,73) *
100 °C	16,00 (±0,29) ***	14,50 (±1,15) ***	14,00 (±0,50) ***	14,00 (±0,33) ***
25 °C (kontroll)	22,00 (±0,58)	19,67 (±0,58)	18,67 (±1,15)	18,67 (±1,00)

A zárójelben feltüntetett számok a szórást jelentik (N=3). A szignifikancia értékeket (p-értékek) a 25 °C-on kezelt mintához viszonyítva határoztuk meg. ***: p<0,0001, **: p<0,005, *: p<0,05, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség.

8. Táblázat. Az *Aspergillus niger* SZMC 601 hifanövekedésének gátlása eltérő koncentrációjú proteináz K-val kezelt 200 µg/ml NFAP jelenlétében.

Proteináz K koncentráció	Gátlási zóna átmérője (mm)			
	48 h	72 h	96 h	120 h
10 mg/ml	14,50(±0,50)*	13,83(±0,76)***	12,33(±0,58)***	12,17(±0,29)***
5 mg/ml	15,67(±0,58)*	16,00(±0,00)***	13,83(±0,29)***	12,83(±0,76)***
2,5 mg/ml	16,83(±0,29)*	16,83(±0,29)***	15,67(±0,58)***	15,00(±0,50)***
1,25 mg/ml	18,50(±0,50)*	17,67(±0,58)***	17,33(±0,29)**	16,83(±0,29)***
0 mg/ml (kontroll)	20,67(±0,58)	20,17(±0,29)	19,17(±0,29)	19,33(±0,58)

A zárójelben feltüntetett számok a szórást jelentik (N=3). A szignifikancia értékeket (p-értékek) a proteináz K kezeletlen mintához (0 mg/ml) viszonyítva határoztuk meg. ***: p<0,0001, **: p<0,005.



11. Ábra. Az 1,25 (1), 2,5 (2), 5 (3), 10 (4), 0 mg/ml (5) proteináz K-val kezelt (16 h, 20 °C) NFAP hatása az *Aspergillus niger* SZMC 601 növekedésére 48 óra, 25°C-on történő inkubáció után.

A többi fonalagomba által termelt defenzinszerű fehérjéhez hasonlóan az NFAP is dózisfüggő módon fejtette ki antifungális aktivitását az érzékeny gombaizolátumokkal szemben (Kaiserer és mtsai., 2003; Marx, 2004). Szubletális koncentrációban alkalmazva (100 µg/ml) az NFAP növekedésgátló hatású volt, azonban magasabb koncentrációban (200 µg/ml) ez a hatás már fungicid jellegűvé vált. Az antifungális hatás tünetei (duzzadt

végű, rövid, elágazó hifa és fragmentált citoplazma) hasonlóak voltak az AFP és PAF esetén leírtakéhoz (Marx, 2004; Meyer, 2008). A szakirodalomban leírt fonalasgombák által termelt PAF-klaszterrel rendelkező defenzinszerű fehérjék szűk, de eltérő fajspecifitású antifungális spektrummal rendelkeznek. Ezek a fehérjék elsősorban más fonalasgombákon fejtenek ki antimikrobiális hatást (Marx, 2004). Az ANAFP, az AFP, a PAF és a NAF különböző koncentrációban alkalmazva (MIC=1-200 µg/ml) hatékonyan gátolja számos tömlős- és járomspórás gomba növekedését, azok spóráinak csírázását (Lacadena és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 1999; Kaiserer és mtsai., 2003; Moreno és mtsai., 2003, 2006; Theis és mtsai., 2003; Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2007, 2008; Barna és mtsai., 2008; Meyer, 2008). Antimikrobiális érzékenységi tesztjeink során kimutattuk, hogy az NFAP hatékonyan gátolja számos, humán patogénként is ismert fonalas tömlősgomba (*A. nidulans*, *A. niger*) spóráinak csírázását és hifáinak növekedését, míg a *R. miehei* kivételével az összes többi járomspórás gombaizolátum rezisztensnek mutatkozott az NFAP-vel szemben. A szakirodalom egyedül az ACLA esetében számol be antibakteriális hatásról, miszerint ez a protein hatékonyan gátolja az általunk is vizsgált Gram-pozitív *M. luteus*, és Gram-negatív *E. coli* baktériumok növekedését (Hajji és mtsai., 2010). Ezt az eredményt fenntartásokkal kell kezelnünk, ugyanis az ACLA-val aminosavssorrendjében teljesen megegyező, szintén az *A. clavatus* által termelt AcAMP esetében ezt a hatást nem írták le (Skouri-Gargouri és Gargouri, 2008). Hasonlóan a többi PAF-klaszterrel rendelkező defenzinszerű proteinhez (Marx, 2004; Meyer, 2008), az NFAP sem mutatott antibakteriális hatást. Egyedül az ANAFP és a FPAP esetén figyeltek meg élesztőkkel (*S. cerevisiae* és *Candida* spp.) szembeni antifungális hatást (Lee és mtsai., 1999; Galgóczy és mtsai., 2013). Ezek a fajok az AFP-hez és PAF-hoz hasonlóan azonban rezisztensnek bizonyultak az NFAP-vel szemben (Marx, 2004).

Az NFAP az AFP-hez és PAF-hoz hasonlóan stabilnak bizonyult extrém pH és hőmérsékleti körülmények között és ellenálló volt proteináz-kezeléssel szemben (Vila és mtsai., 2001; Batta és mtsai., 2009). A fehérjéknek ez a tulajdonsága a diszulfid-hidak által stabilizált harmadlagos szerkezetnek tulajdonítható (Batta és mtsai., 2009).

6.6. A pLGnfp konstrukciója és az NFAP expressziója *A. nidulans*-ban

Annak érdekében, hogy az NFAP által a csírázó konídiumon létrehozott változásokat a csírázás korai szakaszától nyomon tudjuk követni, előállítottunk egy, az NFAP konstitutív termelésére képes *A. nidulans* törzset.

Az NFAP heterológ expressziójához a proteint kódoló cDNS-t egy általunk létrehozott pAMA-alapú expressziós vektorba klónoztuk (pLGnfp). A konstitutív promótert (*gpdA*) és autonóm replikációs szekvenciát tartalmazó vektort (**3. Ábra**) *A. nidulans* CS2902 törzsbe transzformáltuk. 1000 ml *A. nidulans* fermentléből az NFAP tisztítási módszerét alkalmazva 1680 ± 223 μ g heterológ NFAP-t (hNFAP) izoláltunk. A hNFAP mennyisége és a hifák száraztömege nem növekedett szignifikánsan a leoltást követő ötödik nap után.

6.7. A hNFAP antifungális hatása az *A. nidulans* SZMC 0307 és CS2902 törzsek növekedésére

Mikrodilúciós és agardiffúziós módszerrel teszteltük a hNFAP antifungális aktivitását *A. nidulans* SZMC 0307 (korábban érzékenynek bizonyult az NFAP-vel szemben) és a heterológ expressziós rendszer alapját képező *A. nidulans* CS2902 törzsszel szemben.

A hNFAP jelentős antifungális hatást mutatott az alkalmazott koncentráció-tartományban (100-300 μ g/ml) mindkét vizsgálati módszerben egyaránt. Az eredményeket a **9. Táblázat** foglalja össze. A gátlási zónák a leoltást követő 14. napon is megmaradtak.

9. Táblázat. A hNFAP antifungális hatása mikrodilúciós és agardiffúziós tesztben az *Aspergillus nidulans* SZMC 0307 és CS2902 növekedésére 25 °C-on, 48 órán át történő inkubáció után.

Törzs	hNFAP koncentráció (µg/ml)						
	300	200	100	50	25	12,5	0
Mikrodilúciós teszt (növekedési %)							
SZMC 0307	14(±2,4) ^{***}	38(±6,2) ^{***}	59(±4,7) ^{***}	74(±2,8) ^{***}	89(±3,7) ^{nsz}	100	100
CS2902	13(± 4,0) ^{***}	34(±0,6) ^{***}	57(±3,5) ^{***}	71(±3,2) ^{***}	91(±3,5) ^{nsz}	100	100
Agardiffúziós teszt (mm)							
SZMC 0307	22,7(±0,6) ^{***}	17,7(±0,6) ^{***}	13,0(±1,0) ^{***}	0,0(±0,0)	0,0(±0,0)	0,0(±0,0)	0,0(±0,0)
CS2902	22,0(±1,0) ^{***}	17,3(±0,6) ^{***}	14,0(±1,0) ^{***}	0,0(±0,0)	0,0(±0,0)	0,0(±0,0)	0,0(±0,0)

A kezeletlen kontroll növekedését 100%-nak tekintettük. A zárójelben feltüntetett számok a szórást jelentik (N=3). A szignifikancia értékeket (p-értékek) a kezeletlen kontrollokhoz viszonyítva (0 µg/ml NFAP) határoztuk meg. ^{***}: p<0,0001, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség.

A fenti teszt alapján az *A. nidulans* CS2902 gyengén érzékenynek bizonyult a hNFAP-re, így a gombatörzs pLGnfp plazmával transzformált változatán kitűnően tudtuk vizsgálni a heterológ expressziós rendszer önmérgező hatását. Ehhez a transzformáns és a nem transzformáns törzseket eltérő koncentrációkban (10^4 - 10^6 konídium/ml) CM-be oltottuk le, majd az inkubációs idő letelte után lemértük a micéliumok száraztömegét. A transzformánsok esetén hifanövekedés-gátlást állapítottunk meg (**10. Táblázat**). Az önmérgező hatás mértéke függött a leoltáshoz használt konídiumok mennyiségétől (**10. Táblázat**). A nem transzformáns és transzformáns törzsek micéliumainak száraztömege esetén szignifikáns különbség nem mutatkozott 10^4 konídium/ml koncentráció alkalmazásáig. A 10^5 konídium/ml inokulum-koncentráció esetén viszont jelentős csökkenést tapasztaltunk a transzformáns micéliumok száraztömegében a nem transzformánséhoz viszonyítva. Amikor a leoltáshoz 10^6 konídium/ml-t használtunk, teljes önpusztító hatást figyeltünk meg a transzformáns esetében (**10. Táblázat**).

A 10^5 és 10^6 transzformáns konídium/ml leoltásából származó tisztított hNFAP mennyisége megfelelt azoknak a hNFAP koncentráció-értékeknek, amelyek alkalmazásával hasonló mértékű növekedésgátlást értünk el *A. nidulans* CS2902 törzsszel szemben a mikrodilúciós tesztekben megegyező konídium-koncentráció esetén (**9.**

Táblázat). Ezen eredmények alapján a további vizsgálatokban 10^5 konídium-mennyiséget használtunk a leoltásokhoz.

10. Táblázat. Az NFAP-termelő transzformáns és nem transzformáns *Aspergillus nidulans* CS2902 törzsek száraztömege és a fermentlevekből tisztított hNFAP mennyisége 37 °C-on, 7 napon át, 160 rpm-en CM-ben történő inkubáció után.

				Konídium-mennyiség		
				10^4	10^5	10^6
Száraztömeg (mg)						
nem transzformáns (kontroll)				77,3(±4,4)	131,9(±3,8)	182,1(±4,9)
transzformáns				65,0(±3,0) ^{nsz}	88,1(±5,8) ^{***}	00,0(±0,0) ^{***}
Fermentléből	tisztított	hNFAP		73±8,7	127±3,4	309±14,7
koncentrációja (µg/ml)						
A hNFAP	MIC-értéke	(µg/ml)		300	350	350
mikrodilúciós	tesztben					

A zárójelben feltüntetett számok a szórást jelentik (N=3). A szignifikancia értékeket (p-értékek) a nem-transzformáns törzshöz viszonyítva határoztuk meg. ***: $p < 0.0001$, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség.

Munkánk során létrehoztunk egy *A. nidulans*-alapú heterológ expressziós rendszert, mely képes az NFAP-t aktív formában megtermelni. Az *A. nidulans*-alapú konstitutív expressziós rendszer hozama kb. ugyanakkora (1680 ± 223 µg egy liter fermentléből), mint a természetes termelő *N. fischeri* NRRL 181 törzse. Ennek oka az alkalmazott expressziós rendszer „önmérgező” tulajdonsága. A szakirodalom a mai napig nem számolt be Ascomycota eredetű, defenzinszerű molekula heterológ expressziójáról más fonalasgombában. A PAF-ot és az AFP-t korábban már sikeresen expresszáltatták *Pichia pastoris* élesztőgombában (Batta és mtsai., 2009; López-García és mtsai., 2010).

6.8. A hNFAP *A. nidulans* CS2902 transzformánsra gyakorolt antifungális hatása

Munkánk során különböző fluoreszcens festési és szkennning elektronmikroszkópiás eljárásokkal vizsgáltuk a folyadéktenyészetben nevelt hNFAP-termelő *A. nidulans* törzs csírázó konídiumain és fejlődő hifáin létrejövő változásokat.

A sejtmagokat és a sejtfalat DAPI, illetve CFW festéssel vizsgáltuk. Mikroszkópos megfigyeléseink alapján a transzformáns esetében abnormális és késleltetett spóracsírázást mutat a kontroll, nem termelő *A. nidulans* CS2902 törzshöz viszonyítva. A konídiumokból rövid, elágazó, duzzadt végű csíratömlők fejlődtek (**12. Ábra**). 8 óra inkubáció után szerkezetüket elvesztett csíratömlőket, vagy azok teljes szétesését figyeltük meg (**12., 13. és 15. Ábra**). A sérült hifavégeknél a sejtmagok felhalmozódását mutattuk ki DAPI-festéssel (**12. Ábra**). 12 és 24 óra inkubációt követően károsodott, olykor sejtmagjukat elvesztett hifafragmentumok felhalmozódását figyeltük meg a fermentlében (**12. Ábra**).

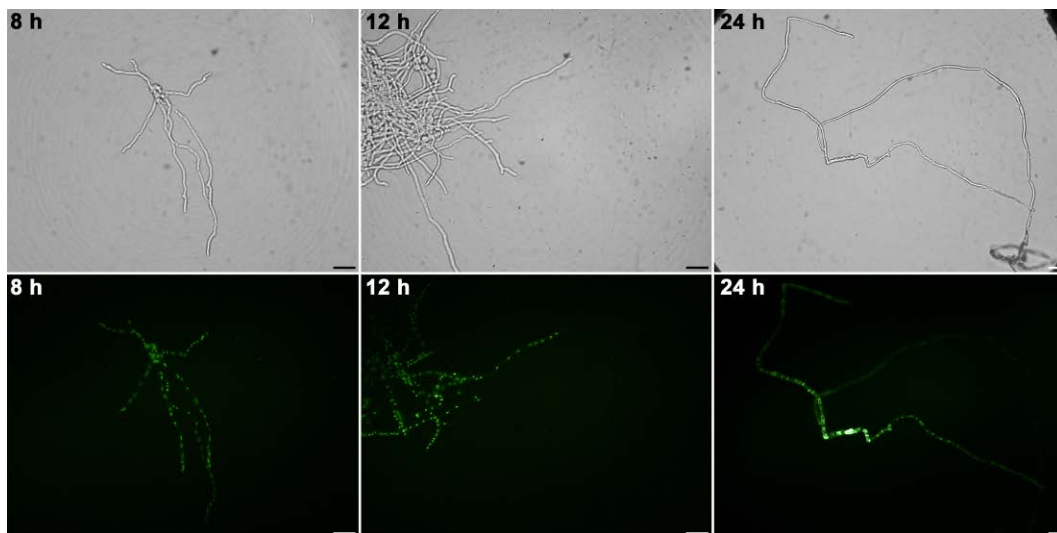
A transzformáns és kontroll (nem transzformáns) törzs sejtfalszerveződésbeli különbségeit a kitinfilamentumok specifikus CFW-festésével mutattuk ki. Az NFAP-termelő transzformánsok esetében sérült és szórt elrendeződésű kitinfilamentumokat figyeltünk meg a képződő hifákban 12 és 24 óra inkubációt követően (**13. Ábra**).

SEM megfigyeléseink alapján a transzformáns konídiumokból fejlődött micélium fala deformált, gyűrött, csavarodott és buborékszerű sejtfalkitüremkedéseket tartalmaz a kontroll, NFAP-t nem termelő törzs micéliumfalához viszonyítva (**13. B Ábra**). Ezek a fenotipikus változások a kitinfilamentumok szerkezetének és szerveződésének károsodását jelzik.

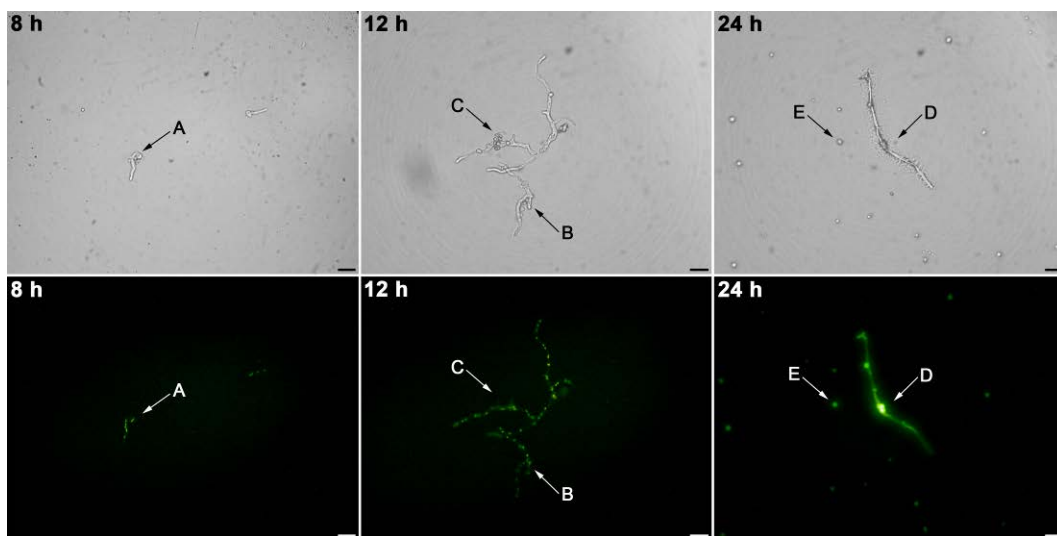
A hNFAP *A. nidulans* transzformánsokra gyakorolt antifungális hatásának megnyilvánulása hasonló az *A. giganteus* által termelt fehérje esetében leírtakéhoz (Theis és mtsai., 2003, 2005; Marx, 2004). Mikroszkópos vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a hNFAP jelenlétében sérül a csírázó konídiumok sejtfalának szerveződése és integritása. Az AFP esetében hasonló tüneteket figyeltek meg: Az AFP elektrosztatikusan kötődik az érzékeny gombafajok sejtmembránjához és sejtfalához, fokozza a membrán áteresztőképességét, és pórusokat képezve károsítja a sejtfal integritását (Theis és mtsai., 2003, 2005). Az AFP képes intracellulárisan felhalmozódni és az intracelluláris membránstruktúrákat lebontani (Theis és mtsai., 2005). A felsorolt tünetek alapján feltételezzük, hogy az NFAP szintén specifikusan kötődik az érzékeny gombafajok sejtfalának külső rétegéhez, ennek igazolására azonban további vizsgálatok szükségesek. Az NFAP-termelő *A. nidulans* törzsben sérül a kitinfilamentumok kiépülése és szerveződése a növekvő hifában. Előzetes *in silico* vizsgálataink alapján az NFAP nem rendelkezik az AFP-re jellemző kitinkötő doménnel, így a kitinfilamentumok sérülését valószínűleg nem az AFP esetében megfigyelt kitin-szintáz specifikus gátlása, hanem a

sejtfal integritásának megszűnése okozza (Hagen és mtsai., 2007). A jelenség molekuláris hátterének pontos megértése további vizsgálatokat igényel.

A.

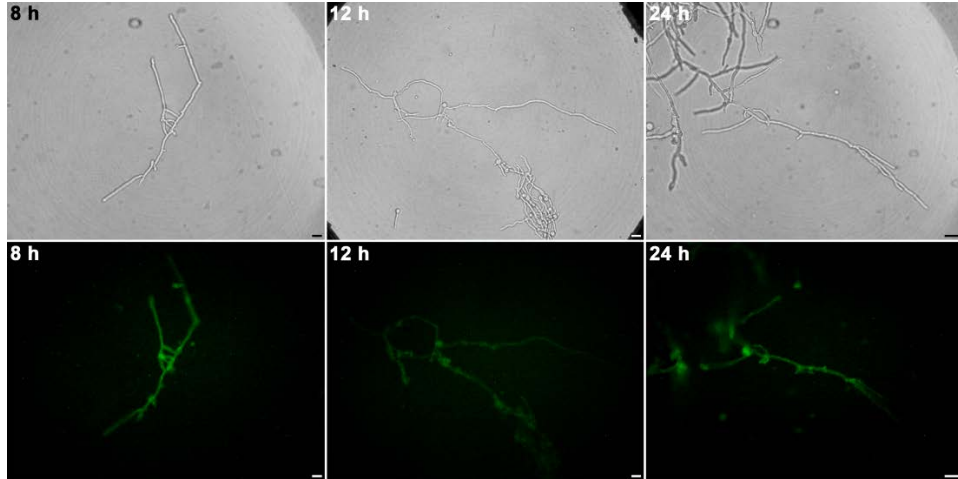


B.

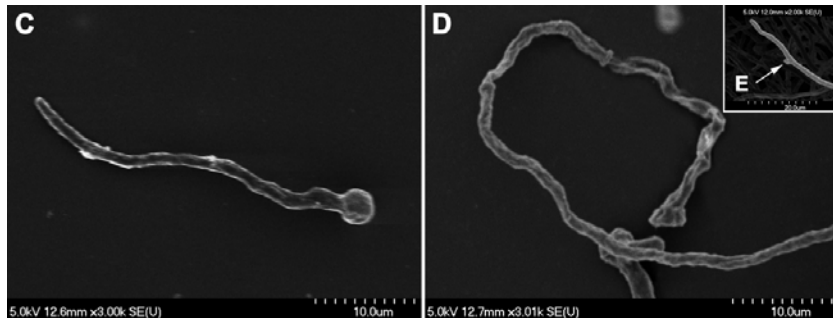
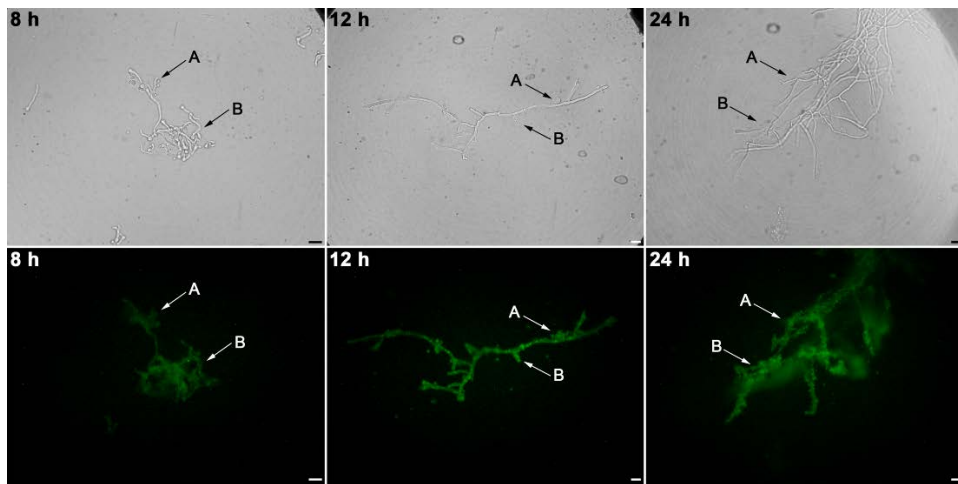


12. Ábra. Csírázó kontroll (nem transzformáns, **A**) és transzformáns (**B**) *Aspergillus nidulans* CS2902 konídiumok DAPI festése 37 °C-os, folyamatos rázatással (160 rpm) történt inkubációt követően. A felső képek fénymikroszkópos, az alsók fluoreszcens mikroszkópos felvételek. **A:** roncsolódott csíratömlők, **B:** felhalmozódott sejtmagok a törött hifavégeknél, **C:** duzzadt hifavégek hifaleválásokkal, **D:** hifamaradvány, **E:** kisméretű micéliummaradvány sejtmaggal. Az egységek hossza 20 µm.

A.

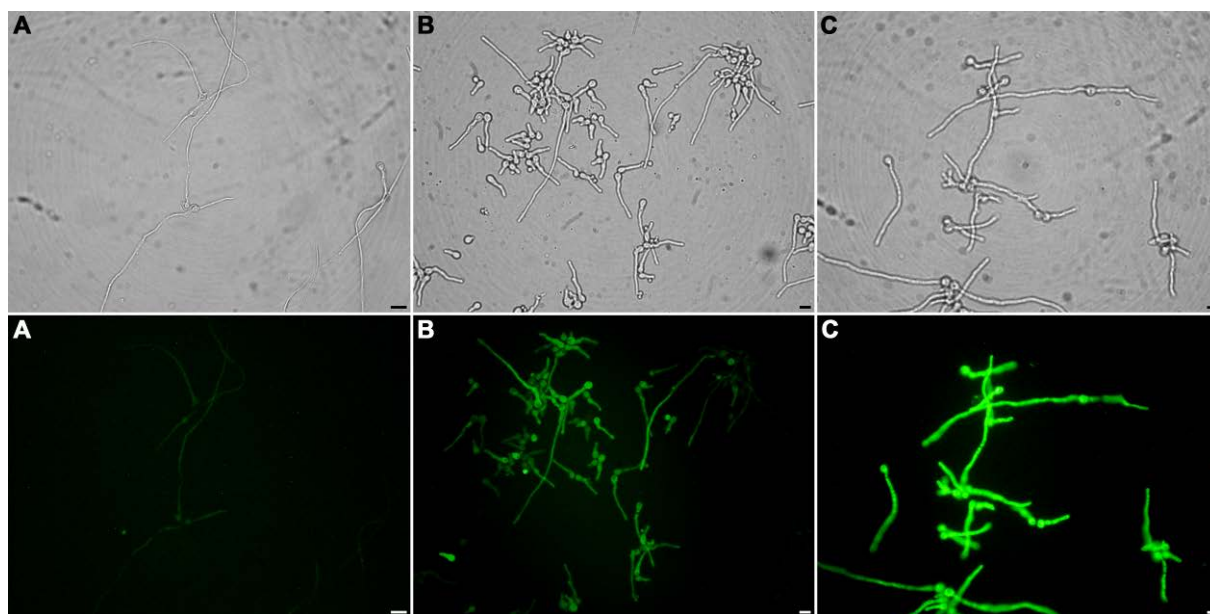


B.



13. Ábra. Csírázó kontroll (nem transzformáns, **A**) és transzformáns (**B**) *Aspergillus nidulans* CS2902 konídiumok CFW-festése 37 °C-os, folyamatos rázatással (160 rpm) történt inkubációt követően. A felső képek fénymikroszkópos, az alsók fluoreszcens mikroszkópos felvételek, az egységek hossza 20 µm. **A**: hifafragmentek sérült kitinfilamentumokkal, **B**: struktúrálatlan sejtfal, **C-D**: kontroll (nem transzformáns, **C**) és transzformáns (**D**) *A. nidulans* CS2902 hifák SEM-képe 12 órás, 37 °C-os, folyamatos rázatással történt inkubációt követően. **E**: a transzformáns micélium sejtfalának buborékszerű kitüremkedése.

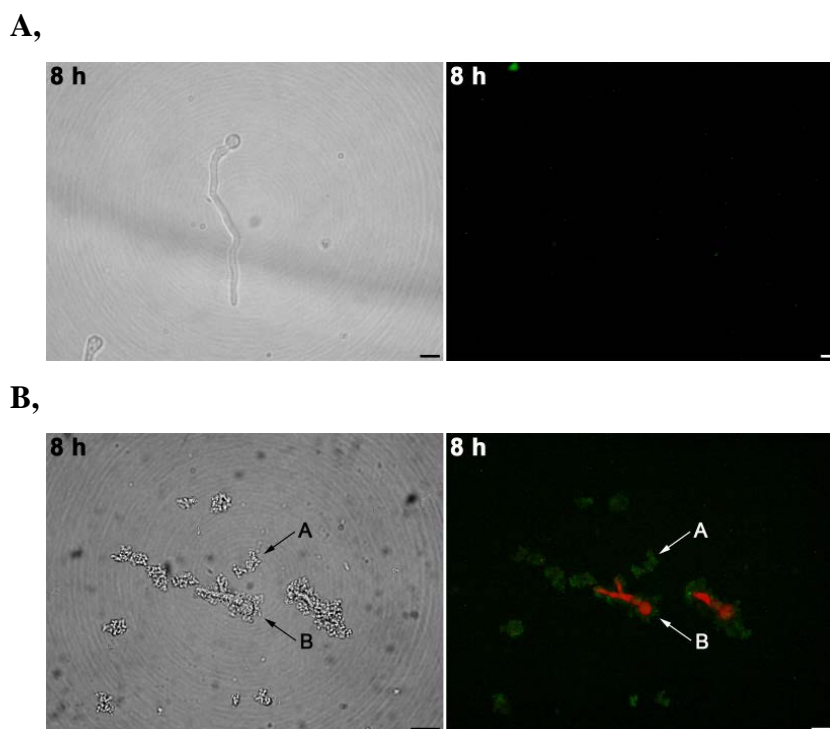
A transzformánsok ROS-termelésének és -felhalmozódásának vizsgálatához H₂DCFDA-festést használtunk. A transzformáns *A. nidulans* CS2902 esetében megemelkedett ROS-szintet mutattunk ki a nem transzformáns törzshöz képest (**14. A és C Ábra**). Hasonló jelenséget figyeltünk meg, ha a nem transzformáns törzseket 5 µg/ml nisztatinnal kezeltük, ami szintén ROS-termelődést vált ki (**14. B Ábra**).



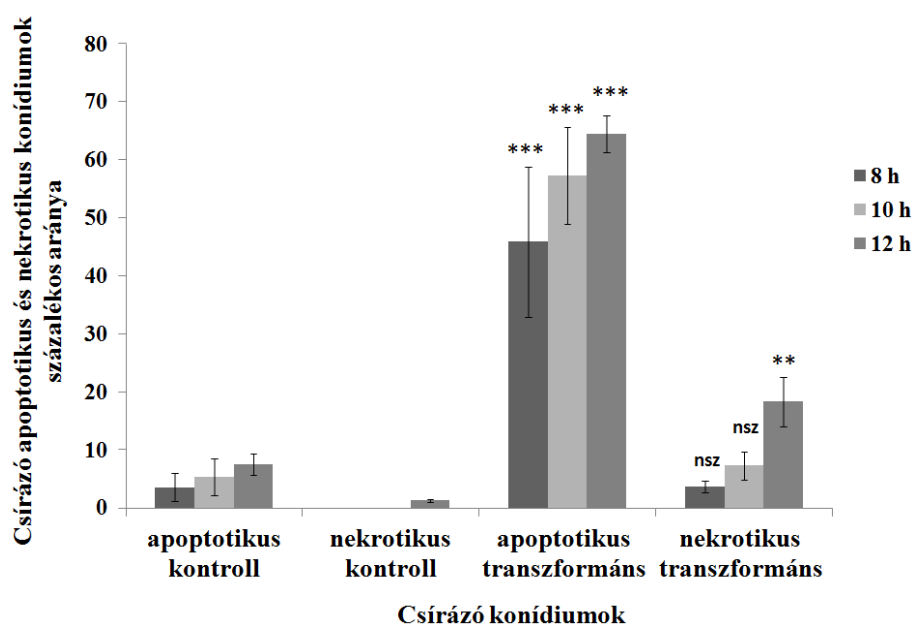
14. Ábra. H₂DCFDA-val festett kontroll (nem transzformáns, **A**), 5 µg/ml nisztatin jelenlétében lévő kontroll (nem transzformáns, **B**) és transzformáns (**C**) *Aspergillus nidulans* CS2902 micéliumok 12 órás, 37 °C-os, folyamatos rázatással történt (160 rpm) inkubációt követően. A felső képek fénymikroszkópos, az alsó képek fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Az egységek hossza 20 µm.

A lehetséges apoptotikus és nekrotikus események kimutatására az *Annexin V-FITC* és propídium-jodid kettős festést használtuk. Az *Annexin V-FITC* festék specifikusan köt a foszfatidil-szerinhez, ezáltal az apoptózis kimutatását teszi lehetővé. Az apoptózis kezdeti szakaszában ugyanis a membrán szerveződésének megváltozása miatt a sejtmembrán belső oldalán található foszfatidil-szerin a külső környezet felé fordul. A propídium-jodid a nekrosis kimutatására szolgál. A festék a már roncsolódott sejtmembránon keresztül bejut a sejtbe, és a DNS-hez kapcsolódik. Az életképes sejteket sem az annexin V-FITC, sem a propídium-jodid nem festi meg. A folyadéktenyészetben nevelt NFAP-termelő *A. nidulans* CS2902 transzformánsok konídiumainak csírázása során, 8 óra inkubációt követően

apoptotikus (zöld, $45,81 \pm 12,95$ %) és nekrotikus (piros, $3,6 \pm 1,1$ %) fenotípust mutató, csírázó konídiumokat egyaránt észleltünk (**15. Ábra**). A kontroll (nem transzformáns) törzs esetében 8 óra inkubáció után kizárólag apoptotikus eseményeket ($3,5 \pm 2,4$ %) mutattunk ki, nekrozist nem észleltünk (**15. A Ábra**). Az apoptotikus csírázó konídiumok száma az inkubációs idővel növekedett mind a transzformáns, mind a nem transzformáns *A. nidulans* törzs esetében, és 12 óra inkubáció elteltével az NFAP-t nem termelő *A. nidulans* CS2902 ($1,2 \pm 0,24$ %) mintában is megjelentek nekrozist mutató, csírázó konídiumok. Általánosságban elmondható, hogy az apoptotikus és nekrotikus csírázó konídiumok száma szignifikánsan megemelkedett 12 óra inkubációt követően a transzformánsok esetében (**16. Ábra**).



15. Ábra. *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma-Aldrich) segítségével festett kontroll (nem transzformáns, **A**) és transzformáns (**B**) *Aspergillus nidulans* CS2902 törzsek csírázó konídiumai 8 óra, 37 °C-on, folyamatos rázatással (160 rpm) történt inkubációt követően. A bal oldali képek fénymikroszkópos, a jobb oldaliak fluoreszcens mikroszkópos felvételek, az egységek hossza 20 μm . **A**: micéliummaradvány, **B**: nekrotikus csírázó konídium.



16. Ábra. Transzformáns és kontroll (nem transzformáns) *Aspergillus nidulans* CS2902 törzsekből származó apoptotikus és nekrotikus csírázó konídiumok százalékos aránya folyadéktenyészetben, 37 °C-on, folyamatos rázatással (160 rpm) történő inkubációt követően. A szignifikancia értékeket (p-érték) az apoptotikus és nekrotikus kontroll konídiumok százalékos értékeihez viszonyítva állapítottuk meg. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,005$, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség.

A transzformáns törzsek csírázása során az intracelluláris ROS emelkedett szintjét, továbbá apoptotikus és nekrotikus tüneteket figyeltük meg. A ROS képződése a programozott sejthalál legfőbb kiváltója. Hasonló hatást írtak le PAF-kezelt *A. nidulans* esetében (Leiter és mtsai., 2005). A PAF képes plazmamembrán-polarizációt indukálni, intracelluláris ROS-t termelni és ROS-okozta programozott sejthalált beindítani (Marx és mtsai., 2008). Az apoptózis mechanizmusának részletesebb megismerése érdekében azonban további tanulmányok és vizsgálatok szükségesek az NFAP esetében.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az NFAP a PAF-hoz hasonlóan képes ROS-t termelni, ezáltal apoptózist és nekrozist indukálni, továbbá képes az AFP esetében megfigyelt tünetet, a kitinfilamentumok sérülését is kiváltani.

6.9. Az egy- és kétértékű kationok hatása a hNFAP antimikrobiális aktivitására

Az egy- és kétértékű kationoknak a hNFAP antifungális tulajdonságára gyakorolt hatását a különböző kationok eltérő koncentrációival kiegészített CM-tápadatokban nevelt transzformáns és nem transzformáns *A. nidulans* CS2902 micéliumok száraztömegének a mérésével vizsgáltuk. A nem transzformáns *A. nidulans* CS2902 törzs esetében szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a CM-, illetve a különböző egy- és kétértékű kationokkal kiegészített CM-tápadatokban nevelt tenyészetek száraztömegei között (**11. Táblázat**). Ezzel szemben, az egy- és kétértékű kationok a hNFAP gátló hatását lecsökkentették a transzformások esetében (**11. Táblázat**). Az emelkedő sókoncentráció (50 és 100 mM KCl, Na₂SO₄ és MgSO₄) az NFAP-termelő transzformáns törzs esetében a micélium száraztömegének szignifikáns növekedését eredményezte (**11. Táblázat**). Szignifikáns különbségeket észleltünk a KCl és a MgSO₄ hatására bekövetkező száraztömeg-növekedés között, ami arra utalhat, hogy a kationok gátló hatása függ azok vegyértékétől is (**11. Táblázat**). Jelentős különbség mutatkozott a KCl és a Na₂SO₄ gátlási képessége között is (**11. Táblázat**). Ez a Na₂SO₄ alkalmazása esetében létrejövő nagyobb kationkoncentrációval magyarázható, mivel a Na⁺ és a K⁺ egyértékű kationok, de egy mól Na₂SO₄ kétszer annyi pozitív töltést tartalmaz, mint az egy mól KCl. A Na₂SO₄ gátlási képessége azonban nagyobb mértékűnek bizonyult, mint a MgSO₄ által létrehozott hatás.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a kationoknak az NFAP antifungális aktivitását semlegesítő hatása inkább a mennyiségük, mint a vegyértékük függvénye.

Munkánk során bizonyítottuk, hogy az NFAP hatását az egy- és kétértékű kationok jelenléte jelentős mértékben lecsökkentette. Eredményeink alapján az egy- és kétértékű kationok proteinaktivitást gátló hatása dózisfüggő módon érvényesült. Ez a gátló hatás elsősorban a kationok mennyiségétől függött inkább, mint azok vegyértékétől. Kísérletünk eredménye összevethető a szakirodalomban leírtakkal: az AFP esetében a >20 mM KH₂PO₄, az 50-100 mM KCl/NaCl, PAF esetében a >20mM MgCl₂ és az 50-100 mM Na₂SO₄ bizonyult gátló hatásúnak (Marx, 2004). Hasonló különböző sók hatására bekövetkező aktivitáscsökkenést mutattak ki növényi és állati β -defenzinszerű fehérjék esetében is (Marx, 2004). Az AFP membránpermeabilizáló hatása szintén kation-érzékenynek bizonyult (Theis és mtsai., 2003). A fent említett adatok alapján feltételezhetjük, hogy az NFAP képes elektrosztatikusan kötni a gomba sejtfalához, membránjához.

11. Táblázat. Különböző sóval kiegészített CM-ben nevelt transzformáns és nem transzformáns *Aspergillus nidulans* CS2902 törzsek micéliumainak száraztömegei mg-ban.

Törzs	Tápközeg			
	CM	CM+KCl	CM+Na ₂ SO ₄	CM+MgSO ₄
50 mM sókoncentráció				
nem transzformáns (kontroll)	132,8(±5,6)	128,9(±7,3) ^{nsz*}	133,9(±3,8) ^{nsz*, nsz†}	138,2(±8,9) ^{nsz*, nsz†}
transzformáns	93,1(±5,0)	103,0(±4,7) [*]	126,0(±1,4) ^{***, ††, †††}	116,7(±1,9) ^{***, ††}
100 mM sókoncentráció				
nem transzformáns (kontroll)	129,1(±14,1)	121,2(±7,2) ^{nsz*, nsz†}	124,0(±4,1) ^{nsz*, nsz†, nsz‡}	132,6(±10,6) ^{nsz*, nsz†, nsz‡}
transzformáns	92,1(±5,2)	118,4(±3,5) ^{**, nsz†}	158,9(±12) ^{***, ††, †††}	138,7(±1,5) ^{***, †, ‡}

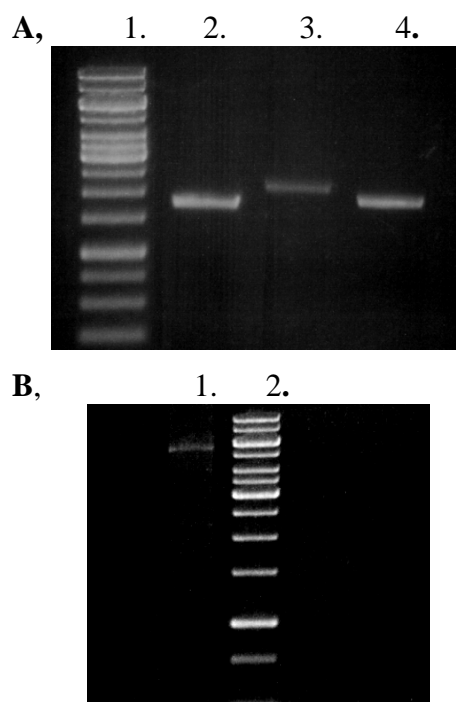
A zárójelben feltüntetett számok a szórást jelentik (N=3). CM: komplett tápoldat. A CM-ből és különböző sókkal kiegészített CM-ből származó száraztömeg-értékek közötti szignifikancia-értékeket (p-értékek) a CM-ből származó száraztömegekhez viszonyítva határoztuk meg. ***: p<0,0001, **: p<0,005, *: p<0,05, nsz: nem szignifikáns különbség.

Az 50 mM sókkal kiegészített CM-ből és a 100 mM sókkal kiegészített CM-ből származó száraztömeg-értékek közötti szignifikancia értékeket (p-értékek) az 50 mM sókkal kiegészített CM-ből származó száraztömegekhez viszonyítva határoztuk meg. †††: p<0,0001, ††: p<0,005, †: p<0,05, nsz†: nem szignifikáns különbség.

A KCl-dal, a Na₂SO₄-tal és a MgSO₄-tal kiegészített CM-ből származó száraztömeg-értékek közötti szignifikancia-értékeket (p-értékek) a KCl-dal kiegészített CM-ből származó száraztömegekhez viszonyítva határoztuk meg. †††: p<0,0001, ††: p<0,005, †: p<0,05, nsz†: nem szignifikáns különbség.

6.10. Az *nfap* deléció konstrukciójának szintézise double-joint PCR-rel

Az *nfap* deléciójához előállítottunk egy olyan lineáris konstrukciót, ami az *nfap* határoló régióin kívül szelekciós markerként a *pyrithiamine* rezisztencia génjét (*ptrA*) is tartalmazta. A reakció első lépésében külön-külön létrehoztuk az *nfap* 5' UTR régiót tartalmazó „A” (1810 bp), az *nfap* 3' UTR régiót tartalmazó „C” (1951 bp), illetve a *pyrithiamine* rezisztenciagént és az UTR régiókkal átfedő részt tartalmazó „B” (2200 bp) amplikonokat (**17. A Ábra**). Ezután az „A” és „C” amplikonokat összeszereltük a kimérákat tartalmazó „B” amplikonnal a *nested* indítószekvenciák felhasználásával (5913 bp). (**17. B Ábra**)



17. Ábra. A *double-joint* PCR során amplifikált DNS-szakaszok. Az első lépés (A): 1. *GeneRuler 1 kb DNS létra* (Thermo Scientific), 2. „A” amplikon, 3. „B” amplikon, 4. „C” amplikon. A második lépés (B): 1. deléciós konstrukció, 2. *GeneRuler 1 kb DNA létra* (Thermo Scientific).

6.11. A $\Delta nfap$ mutáns *Neosartorya fischeri* NRRL 181 törzs létrehozása

Az NFAP biológiai szerepének tanulmányozásához egy *nfap* deléciós *N. fischeri* NRRL 181 törzset állítottunk elő. A mutáns törzs létrehozásához a lineáris deléciós konstrukcióval elvégeztük a *N. fischeri* NRRL 181 izolátum transzformációját.

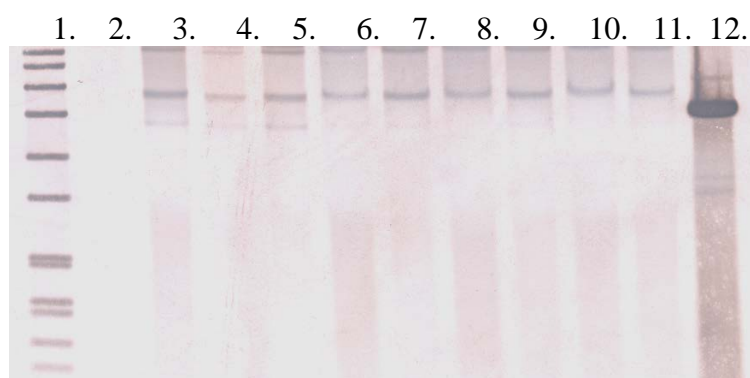
A transzformáns telepek a transzformációt követő 2-3. nap során jelentek meg. A kísérletek során létrehozott transzformánsok szelekcióját a *pyrithiamine*-rezisztencia markergén alapján végeztük, melyek genotípusát a genomi DNS *EcoRV*-tel történő emésztése után *Southern blot* analízissel ellenőriztük (18. Ábra).

Munkánk során sikeresen kiűtöttük az *nfap*-t a *N. fischeri* NRRL 181 izolátum genomjából. A *Southern blot* analízis kimutatta, hogy a transzformánsokban a bevitt konstrukció az *nfap* gén helyére sikeresen beépült, azonban ektopikus integráció következtében további beépülések is létrejöttek.

A,



B,



18. Ábra. Az *nfp* (A) és a *ptrA* (B) génpróbákkal végzett *Southern blot* analízis. 1. *DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled* (Roche), 2. *Neosartorya fischeri* NRRL 181 vad típus, 3-11. transzformánsok, 12. pSK275 plazmid.

6.12. A vad típusú és a Δnfp mutáns *Neosartorya fischeri* NRRL 181 növekedésének vizsgálata

Vizsgáltuk a vad típusú és deléciós mutáns törzsek növekedését, továbbá az említett törzsek *in vitro* antagonizmusra való képességét az NFAP-re érzékeny és ellenálló, hasonló ökológiai niche-t elfoglaló gombaizolátumokkal szemben CM és MM táptalajon.

Eredményeink alapján, a CM táptalajon a mutáns törzs a vad típushoz hasonló mértékű növekedést mutat. Habár a 24, 48 és 72 óra inkubáció után szignifikáns eltérés még megfigyelhető volt a két különböző törzs növekedési tulajdonságában, azonban ez az eltérés a későbbiekben eltűnt. A MM táptalaj csökkentett, nehezen hozzáférhető tápanyagtartalma stresszfaktort jelent a gomba számára. A MM táptalajon vizsgált vad és mutáns törzsek növekedése között nagyobb mértékű különbség volt észlelhető, mint a CM

táptalaj esetében. A MM táptalajon 24, 48 és 72 óra után mért növekedési adatok kivételével minden esetben szignifikáns különbség volt megfigyelhető a vad és mutáns törzsek növekedése között, amely mértéke az idő elteltével fokozatosan növekedett. Eredményeinket a **12. Táblázat** foglalja össze.

12. Táblázat. A vad és a $\Delta nfap$ mutáns *Neosartorya fischeri* törzsek növekedése 25 °C-on, komplett és minimál táptalajon.

Idő	Telepátmérő komplett táptalajon (mm)		Telepátmérő minimál táptalajon (mm)	
	vad típus	$\Delta nfap$	vad típus	$\Delta nfap$
24h	13,3±0,6	10±0,0 ^{**}	11,3±0,6	11,7±0,6 ^{nsz}
48h	24,3±0,6	20,3±0,6 ^{**}	19±1,0	18,3±0,6 ^{nsz}
72h	35,7±0,6	32,0±1,7 [*]	27,7±0,6	25,3±0,6 [*]
96h	43,7±0,6	41,7±1,5 ^{nsz}	35,7±2,1	32,3±1,2 [*]
120h	52±1,0	50,3±0,6 ^{nsz}	44,7±1,2	39,7±0,6 ^{**}
144h	64,3±0,6	62,3±0,6 ^{nsz}	56±1,0	42,7±0,6 ^{***}
168h	71,7±0,6	71,0±1,0 ^{nsz}	63±2,0	48,0±1,0 ^{***}

A szignifikancia értékeket (p-értékek) a vad típus telepátmérőjéhez viszonyítva határoztuk meg. ^{***}: p<0,0001, ^{**}: p<0,005, ^{*}: p<0,05, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség.

Eredményeink összefoglalásaként megállapítottuk, hogy a vad típushoz képest a $\Delta nfap$ mutáns törzs szignifikánsan lassabb mértékű növekedést mutatott MM táptalajon. Ez a megfigyelés az NFAP-nek a gomba növekedésében betöltött szerepére enged következtetni éhezés indukálta stressz körülmények között (**12. Táblázat**).

6.13. A vad típusú és a $\Delta nfap$ mutáns *Neosartorya fischeri* NRRL 181 *in vitro* antagonizmusa tömlős- és járomspórás gombákkal szemben

A fonalgombák által termelt defenzinszerű proteinek biológiai szerepe mindezidáig nem tisztázott. Feltételezések szerint a fonalgomba-fajok számára az általuk termelt defenzinszerű antifungális proteinek nagymértékű előnyt biztosítanak a tápanyagokért és az élőhelyért folytatott versenyben olyan gombafajokkal szemben, melyek hasonló ökológiai niche-t foglalnak el (Hegedűs és Marx, 2013). Munkánk egyik célja volt, hogy ezt a feltételezést bizonyítsuk *in vitro* antagonizmus-tesztekben NFAP-t termelő *N. fischeri* NRRL 181 és NFAP-deléciós mutánsán keresztül. A vizsgálatokba

olyan járomspórás és tömlősgomba-izolátumokat vontunk be, amelyek feltételezhetően hasonló ökológiai niche-t foglalnak el, mint a *N. fischeri*, így kompetítor mikroorganizmusként léphetnek fel vele szemben a tápanyagok megszerzésért és a megfelelő élőhelyért folytatott versenyben. Az *in vitro* antagonizmus-teszteket CM, és MM táptalajon is elvégeztük. Az MM csökkentett, nehezen hozzáférhető tápanyagtartalma stresszfaktort jelent a gomba számára, ami korábbi ismereteink alapján elősegíti és fokozza az NFAP expresszióját, hasonlóan a többi fonalasgomba defenzinszerű proteinhez (Meyer és Stahl, 2003).

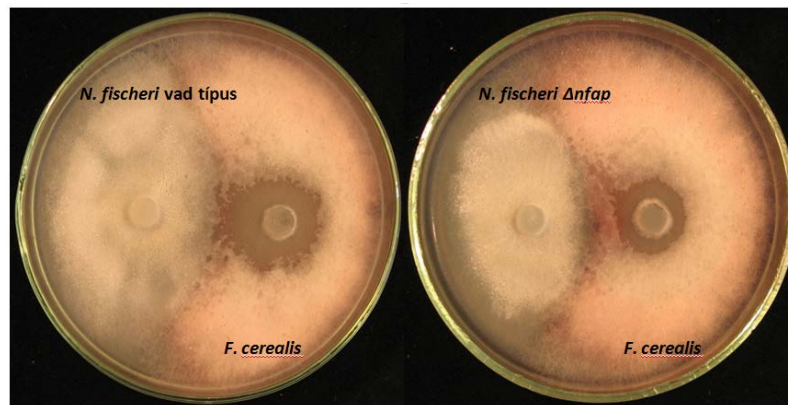
A vizsgált *N. fischeri* törzsek *in vitro* antagonizmusra való képességét az *in vitro* antagonizmus index-szel (IVAI) jellemeztük (Szekeres és mtsai., 2006). Ezen felül, vizsgáltuk a *N. fischeri* törzsek és a kompetítor gombaizolátum között kialakuló gátlási kölcsönhatások jellegét.

A IVAI-értékek és a gátlási zóna megléte alapján *in vitro* antagonizmus-kísérleteink eredményeként összefoglalva megállapíthatjuk: a vad típusú törzs a deléciós törzshöz képest szignifikánsan hatékonyabban gátolta a járomspórás gombák közül az *Actinomucor elegans* NRRL 1706, a *Mortierella nantahalensis* NRRL 5842, a *Backusella circina* NRRL 3293, a *Mucor rammanianus* WRL CN(M)304, a *R. miehei* CBS 360.92; a tömlősgombák közül az *A. giganteus* IMI 343707, a *Fusarium cerealis* SZMC 11048, a *F. graminearum* SZMC 11054, a *Fusarium poae* SZMC 11045 és a *F. polyphialidicum* SZMC 11042 izolátumok növekedését. A vad típusú törzs gátló hatása elsősorban MM táptalajon érvényesült (**19. és 20. Ábra**). Amennyiben a vad és deléciós mutáns törzsek növekedésgátló hatást mutattak ugyanazon kompetítor gombaizolátummal szemben, a deléciós törzs IVAI-értéke szignifikánsan kisebb volt (**19. és 20. Ábra**). Említésre érdemes tény, hogy az antifungális érzékenységi tesztheinkben (mikrodilúciós és agardiffúziós módszer) a járomspórás gombaizolátumok ellen a *R. miehei* (CBS 360.92) kivételével a tisztított NFAP nem volt hatékony. Érdekes módon ezzel szemben, az *in vitro* antagonizmus-tesztben az NFAP-termelő *N. fischeri* képes volt több járomspórás gombaizolátum növekedését is gátolni.

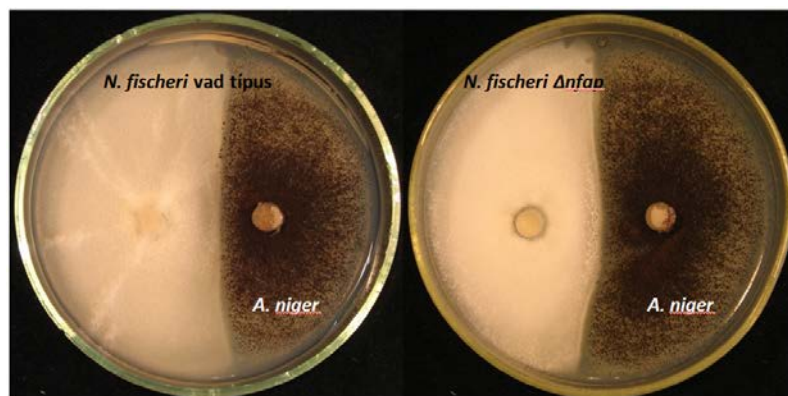
Az *N. fischeri* törzsek nem gátolták a járomspórás gombák közül a *Mortierella ramanniana* NRRL 5844, a *Syncephalastrum racemosum* SZMC 11084, a *Mycotypha africana* NRRL 2978; a tömlősgombák közül az *Aspergillus japonicus* SZMC 2157, az *A. niger* SZMC 2608, az *Aspergillus terreus* SZMC 2414, a *P. chrysogenum* IMI 392 788, a *T. longibrachiatum* UAMH 7955 növekedését. Ezekben az esetekben negatív vagy

semleges kölcsönhatást tapasztaltunk. A *Gilbertella persicaria* IMI 101638(+) és a *Rhizopus oryzae* CBS 146.90 izolátumokkal végzett *in vitro* antagonizmus-kísérleteink értékelhetetlenek voltak az említett izolátumok fokozott légmicélium-képzése miatt.

Eredményeinket a **13. Táblázat**ban foglaltuk össze.



19. Ábra. A *Neosartorya fischeri* NRRL 181 (vad és $\Delta nfap$ törzsek) és a *Fusarium cerealis* SZMC 11048 *in vitro* antagonizmusa MM táptalajon 25 °C-on, 10 napig történt inkubáció után.



20. Ábra. A *Neosartorya fischeri* NRRL 181 (vad és $\Delta nfap$ törzsek) és az *Aspergillus niger* SZMC 2608 *in vitro* antagonizmusa CM táptalajon 25°C-on, 10 napig történt inkubáció után.

13. Táblázat. A vad típusú és a $\Delta n\text{fap}$ mutáns *Neosartorya fischeri* NRRL 181 *in vitro* antagonizmusra való képességének vizsgálata járomspórás és tömlősgomba-izolátumokkal szemben komplett és minimál táptalajon 25, illetve 37 °C-on, 10 nap inkubáció után.

Faj	Komplett táptalaj		Minimál táptalaj	
	vad (IVAI)	$\Delta n\text{fap}$ (IVAI)	vad (IVAI)	$\Delta n\text{fap}$ (IVAI)
Járomspórás gomba				
<i>Actinomucor elegans</i> (NRRL 1706)	37,81±1,92 ⁺	32,64±0,24 ⁺ ; **	47,34±3,11 ⁺	20,55±0,13 ⁺ ; ***
<i>Backusella circina</i> (NRRL 3293)	23,26±1,41 ⁺	22,24±2,36 ⁺ ; nsz	27,66±1,73 ⁺	26,81±2,53 ⁺ ; nsz
<i>Mortierella ramanniana</i> (NRRL 5844)	55,22±3,72 ⁻	50,64±0,53 ⁻ ; *	41,02±4,87 ⁰	37,72±2,01 ⁰ ; nsz
<i>Mortierella nantahalensis</i> (NRRL 5842)	35,82±2,62 ⁺	29,96±2,53 ⁺ ; *	51,42±2,07 ⁺	49,86±3,88 ⁺ ; nsz
<i>Mucor rammanianus</i> (WRL CN(M)304)	71,43±0,59 ⁻	66,27±2,28 ⁻ ; **	41,02±9,38 ⁺	27,97±4,42 ⁺ ; *
<i>Mycotypha africana</i> (NRRL 2978)	81,24±0,63 ⁻	79,05±0,56 ⁻ ; nsz	95,29±0,44 ⁻	96,35±0,33 ⁻ ; nsz
<i>Rhizomucor miehei</i> (CBS 360.92)	47,68±1,69 ⁰	39,71±1,88 ⁰ ; ***	44,72±5,23 ⁺	37,75±2,51 ⁺ ; *
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (SZMC 11084)	50,36±1,53 ⁰	43,69±2,47 ⁰ ; **	39,30±0,39 ⁰	37,72±5,20 ⁰ ; nsz
Tömlősgomba				
<i>Aspergillus giganteus</i> (IMI 343707)	50,80±1,62 ⁰	46,76±1,52 ⁰ ; *	42,23±7,07 ⁺	40,14±0,88 ⁺ ; nsz
<i>Aspergillus japonicus</i> (SZMC 2157)	43,63±0,26 ⁰	46,00±0,56 ⁰ ; nsz	38,03±1,72 ⁰	36,78±2,77 ⁰ ; nsz
<i>Aspergillus niger</i> (SZMC 2608)	52,88±2,00 ⁰	45,56±2,79 ⁰ ; **	44,29±4,62 ⁰	43,60±1,18 ⁰ ; nsz
<i>Aspergillus terreus</i> (SZMC 2414)	66,55±1,19 ⁻	63,67±2,97 ⁻ ; nsz	68,73±2,32 ⁻	64,94±3,75 ⁻ ; nsz
<i>Fusarium cerealis</i> (SZMC 11048)	45,45±2,31 ⁺	40,64±2,77 ⁺ ; *	45,33±1,76 ⁺	29,84±4,68 ⁺ ; ***
<i>Fusarium graminearum</i> (SZMC 11054)	37,59±2,21 ⁺	36,50±1,12 ⁺ ; nsz	28,96±1,45 ⁺	32,15±3,98 ⁺ ; ***
<i>Fusarium poae</i> (SZMC 11045)	36,31±2,67 ⁺	35,64±1,26 ⁺ ; nsz	29,40±0,88 ⁺	26,25±2,79 ⁺ ; nsz
<i>Fusarium polyphialidicum</i> (SZMC 11042)	40,92±2,18 ⁺	38,68±2,02 ⁺ ; ***	32,20±1,34 ⁺	33,92±2,44 ⁺ ; nsz
<i>Penicillium chrysogenum</i> (IMI 392 788)	67,98±3,12 ⁰	67,08±2,75 ⁰ ; nsz	71,89±1,66 ⁰	72,38±5,35 ⁰ ; nsz
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (UAMH 7955)	9,72±0,74 ⁻	5,23±0,41 ⁻ ; **	12,21±1,14 ⁻	9,47±1,36 ⁻ ; nsz

Jelmagyarázat: ⁻: negatív hatás, ⁺: pozitív hatás, ⁰: semleges hatás. A szignifikancia értékeket (p-értékek) a vad típus IVAI értékéhez viszonyítva határoztuk meg. ***: p<0,0001, **: p<0,005, *: p<0,05, nsz: nem szignifikáns különbség. IVAI: *in vitro* antagonizmus index.

Pozitív hatás (⁺): *N. fischeri* visszaszorítja a másik gomba növekedését, közöttük gátlási zóna alakul ki, a másik gombafaj telepszéle homorú morfológiát mutat, vagy a *N. fischeri* ránő. Negatív hatás (⁻): A *N. fischeri* növekedése gátlódik, telepszéle homorú morfológiát mutat, vagy a másik izolátum ránő. Semleges hatás (⁰): Nincs kölcsönhatás a két gombafaj között, nem alakul ki gátlási zóna, a telepek összeérnek, egymással szembe eső telepszéleik egyenletes növekedésűek.

Kísérleteink eredményei jelzik azt, hogy elsősorban a stressz (csökkentett, nehezen hozzáférhető tápanyagtartalom, a másik gomba jelenléte, illetve az ennek következtében létrejövő tápanyagfogyás) hatására termelődő NFAP szerepet játszik az adott élőhelyért folytatott versenyben is a hasonló ökológiai niche-t elfoglaló gombával szemben. Ezt az eredményt azért fenntartással kell kezelnünk, ugyanis a *Δnfap* mutáns törzs az *nfap* deléciója mellett a deléciós konstrukció további, ektopikus integrációit is hordozza.

Eredményeink összevethetők a szakirodalomban megtalálható, hasonló kísérletek eredményeivel: AFP-t termelő *A. giganteus* izolátummal végzett *in vitro* antagonizmus kísérletek során kimutatták, hogy egy hasonló ökológiai niche-t elfoglaló fonalagomba jelenléte fokozza az *afp* gén expresszióját, ezáltal a környezetben megnőtt AFP mennyisége előnyt biztosít az *A. giganteus* számára a hasonló élőhelyért folytatott küzdelemben, amennyiben a kompetítor gomba érzékeny az antifungális proteinnel szemben (Meyer és Stahl, 2003). A mi munkákhöz hasonlóan ebben a kísérleti rendszerben is az alkalmazott táptalaj összetétele befolyásolta az *A. giganteus* antagonista képességét (Meyer és Stahl, 2003). A fonalagombák által termelt, defenzinszerű antifungális proteinek további biológiai szerepének vizsgálata során időközben megfigyelték, hogy a mitospóra fejlődéséért felelős központi szabályozó gének expressziójának modulálásával a PAF fokozza a termelő gomba aszexuális szaporodását stressz körülmények között. Ezt a hipotézist a *P. chrysogenum* esetében sikerült alátámasztani egy *paf*-deléciós törzs létrehozásával, amelyben a mitospóra kialakulásának szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető (Hegedűs és mtsai., 2011a), következtetésképpen a PAF a konidiogenezis beindításával, intenzitásának a növelésével elősegíti a gomba túlélését stressz körülmények között, amit akár egy másik gomba jelenléte is kiválthat.

7. Összefoglalás

Az 1990-es évek második felétől számos, a defenzinokhoz hasonló szerkezetű, kis tömegű, antifungális hatással rendelkező proteint izoláltak és jellemeztek fonalas tömlősgombákból. A PAF klasztert tartalmazó defenzinszerű fehérjék közül az AFP, AFP_{NN5353}, ANAFP, ACLA, AcAMP, FPAP, PAF, NAF és PgAFP az izolált és a jellemzett. A rendszertanilag távol álló gombafajok által termelt, szerkezetileg hasonló defenzinszerű proteinek hatásmódja és antimikrobiális spektruma jelentősen eltér egymástól, így külön-külön is értékes alapot szolgáltathatnak alap- és alkalmazott kutatások számára. A *N. fischeri* antifungális protein (NFAP) egy hipotetikus antifungális protein, jelenléte csak *in silico* bizonyított. Klónozásáról, izolálásáról, antimikrobiális spektrumáról, hatásmódjáról és biológiai szerepéről nem jelent meg publikáció a mai napig. Munkánk során célul tűztük ki a feltételezett NFAP proteint kódoló gén izolálását, az NFAP izolálását és molekuláris jellemzését, továbbá, a tisztított NFAP antifungális aktivitásának vizsgálatát. Vizsgáltuk az Ascomycota defenzinszerű proteinek evolúciós rokonsági kapcsolatát is. További céljaink közt szerepelt az NFAP antifungális hatásmechanizmusának vizsgálatára alkalmas *A. nidulans*-alapú heterológ expressziós rendszer létrehozása, illetve az NFAP biológiai szerepének felderítése érdekében egy $\Delta nfap$ mutáns gombatorzs előállítása.

Kísérleteink során izoláltuk a tömlősgomba defenzinszerű fehérjékkel homológ *nfap*-t a *N. fischeri* NRRL 181 izolátumból. Az *in silico* vizsgálatok eredményeként az érett NFAP egy 57 aminosavból álló, 6,6255 kDa tömegű, cisztein-gazdag, bázikus (pI=8,93) protein. Aminosavszekvenciája 10,3-22,8% homológiát mutat a szakirodalomban korábban leírt hasonló fehérjékkel. Az NFAP három diszulfid-híd által stabilizált harmadlagos szerkezete (5 β -lemez hurokrégiókkal összekapcsolva) nagyon hasonló a többi fonalasgomba által termelt defenzinszerű molekulák szerkezetéhez.

Vizsgáltuk az NFAP filogenetikai kapcsolatát más tömlősgomba eredetű, defenzinszerű antifungális fehérjével. A tömlősgombák által termelt defenzinszerű antifungális proteinek filogenetikai vizsgálatok alapján két nagy csoportot alkotnak: a PAF-klaszterrel rendelkező proteinek és a BP-klaszterrel rendelkező proteinek csoportját. Vizsgálataink alapján a *B. fuckeliana* által termelt protein egy új csoportot képvisel. Megállapítottuk, hogy az NFAP a PAF-tól és az *A. niger* által termelt ANAFP-tól elkülönülő AFP-rokon kládban helyezkedik el.

Az *nfap* promóter analízise során külső környezeti szignálokra és stresszhatásra termelődő transzkripciós faktorok kötőhelyeit azonosítottuk. Ezek figyelembevételével sikerült optimalizálnunk az NFAP termelődését elősegítő tápközeget és tenyésztési körülményeket. Sikerült izolálnunk a fermentlé antifungálisan aktív frakcióiból egy ~6,6 kDa tömegű fehérjét és az általunk alkalmazott módszerrel 1000 ml fermentléből 1250 ± 123 μ g NFAP-t tisztítanunk.

Antimikrobiális érzékenységi vizsgálataink során öt-öt különböző fajba tartozó járomspórás és tömlősgomba-izolátumból két Ascomycota (*A. niger* és *A. nidulans*) és egy Zygomycota (*R. miehei*) érzékenynek mutatkozott az NFAP antifungális hatásával szemben (12,5-200 μ g/ml). Hasonlóan a fonalgombák által termelt defenzinszerű fehérjékhez, az NFAP antifungális aktivitása is dóziszfüggő, ugyanis kimutattuk, hogy *A. niger*-rel szemben a fehérje szubletális koncentrációban alkalmazva (100 μ g/ml) növekedésgátló, azonban magasabb koncentrációban (200 μ g/ml) fungicid hatású. Az NFAP hatására az érzékeny gombán a szakirodalomban leírt rokon proteinekéhez (AFP, PAF) hasonló fenotipikus változásokat mutattunk ki: a spórák csírázása gátlódik; késleltetett, torzult, elágazó hifanövekedés jön létre. Az *A. corymbifera*, a *B. cinerea*, a *F. graminearum*, a *M. wolfii*, a *M. piriformis*, a *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* és a *T. longibrachiatum* az általunk alkalmazott *in vitro* tesztekben rezisztensnek bizonyultak az NFAP-vel szemben.

Kimutattuk, hogy az NFAP a PAF-hoz és AFP-hez hasonlóan stabilitását tág pH tartományon (pH=7,0-9,0) belül és magas hőmérsékletkezelés (30 perc, 100 °C) ellenére is megőrzi, továbbá azt, hogy a protein nagymértékben ellenálló proteolitikus kezeléssel (10 mg/ml proteináz K, 30 °C, 16 h) szemben.

Munkánk során egy plazmid-alapú expressziós rendszer létrehozásával sikerült az NFAP konstitutív heterológ expresszióját megvalósítanunk egy előzetesen kismértékben NFAP-érzékenynek bizonyult *A. nidulans* törzsben. Az NFAP-termelő *A. nidulans* törzs csökkentett hifanövekedést mutatott a nem transzformánshoz viszonyítva, melynek mértéke függött a leoltáshoz használt konídium-mennyiségtől: szignifikáns különbség nem mutatkozott 10^4 konídium/ml mennyiség alkalmazásáig, 10^5 konídium/ml esetében viszont jelentős csökkenés, 10^6 konídium/ml esetében már teljes önpusztító hatás következett be. Az expressziós rendszer hozama az „önmérgező” jellegéből fakadóan kb. ugyanakkora volt (1680 ± 223 μ g egy liter fermentléből), mint a natív termelőé. Vizsgálataink során sikerült kimutatnunk, hogy az NFAP a PAF-hoz hasonlóan képes ROS-termelést kiváltani, ezáltal

apoptózist és nekrozist indukálni, továbbá képes az AFP esetében megfigyelt tünetet, a kitinfilamentumok kiépülésének a zavarát is kiváltani a fejlődő hifában.

Munkánk során bizonyítottuk, hogy a hNFAP-okozta önmérgező hatást az egy- és kétértékű kationok jelenléte jelentős mértékben, dóziszfüggő módon csökkentette. Az emelkedő sókoncentráció (50 és 100 mM KCl, Na₂SO₄ és MgSO₄) az NFAP-termelő transzformáns törzs esetében a micélium száraztömegének jelentős növekedését eredményezte. A KCl hatására bekövetkező hatásnál szignifikánsan nagyobb mértékű gátlást tapasztaltunk MgSO₄ esetében, a legnagyobb gátlási képességet Na₂SO₄ alkalmazásával érték el. A fent említett adatok alapján feltételezhető, hogy az NFAP képes elektrosztatikusan kötni a gombasejthez.

Munkánk során előállítottuk a *N. fischeri* NRRL 181 NFAP-t kódoló génben deléciós mutánsát ($\Delta nfap$). Vizsgáltuk a vad típusú és deléciós mutáns törzsek növekedését, továbbá az említett törzsek *in vitro* antagonizmusra való képességét (*in vitro* antagonizmus index, IVAI) az adott proteinre érzékeny és ellenálló, hasonló ökológiai niche-t elfoglaló gombaizolátumokkal szemben komplett (CM) és minimál (MM) táptalajon. Kimutattuk, hogy a vad típushoz képest a $\Delta nfap$ mutáns törzs szignifikánsan lassabb növekedést mutatott MM-táptalajon. Ez a megfigyelés az NFAP-nek a gomba növekedésében betöltött szerepére enged következtetni éhezés indukálta stressz körülmények között. A vad típusú törzs szignifikánsan hatékonyabban gátolta az NFAP-érzékeny izolátumok növekedését, mint a deléciós törzs. A vad típusú törzs gátló hatása elsősorban minimál táptalajon érvényesült. Amennyiben a vad és deléciós mutáns törzsek növekedésgátló hatást mutattak ugyanazon kompetítor gombaizolátummal szemben, a deléciós törzs IVAI-értéke szignifikánsan kisebb volt. Mindezek jelzik azt, hogy elsősorban a stressz (csökkentett, nehezen hozzáférhető tápanyagtartalom; a másik gomba jelenléte, illetve az ennek következtében létrejövő tápanyagfogyás) hatására termelődő NFAP szerepet játszik az adott élőhelyért folytatott versenyben is a hasonló ökológiai niche-t elfoglaló gombával szemben.

Munkánk eredménye bővíti az ismertté vált és jellemzett, fonalasgombák által termelt defenzinszerű antifungális proteinek számát. Az NFAP az általunk megfigyelt tulajdonságai alapján ígéretes jelölt lehet gyakorlati célú felhasználásra, továbbá új szintetikus antifungális protein-analógok alapjául szolgálhat a közeljövőben az antimikrobiális spektrumának, pontos hatásmódjának és szerkezet-hatás összefüggésének vizsgálata után.

8. Angol nyelvű összefoglaló (Summary in English)

From the second half of the 1990s, several extracellular cysteine-rich proteins with remarkable antifungal activity have been isolated and characterized from filamentous Ascomycetes. They are small molecular mass, basic, cationic, cysteine-rich peptides with highly similar structure to the defensins. Despite the fact that they are very different in their amino acid sequences, conserved homologous regions can be identified. Based on these regions, these molecules can be divided into two groups: proteins with the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF)-cluster and proteins with the *Penicillium brevicompactum* „bubble protein” (BP)-cluster. Until now, proteins with PAF-cluster have been isolated and characterised from six different fungal species (*Aspergillus clavatus*, *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium polyphialidicum*, *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium nalgiovense*). The proteins with PAF-cluster have remarkable antifungal effect against filamentous fungi. They generate similar symptoms in the susceptible organisms, but their mode of action could be different. It is supposed that they play a role in the competition for nutrients and habitat against microorganisms with similar ecological niche and in the asexual differentiation of the producing microorganism under stress conditions.

The defensin-like antifungal proteins produced by taxonomically distinct species have similar structures, but their mode of action and antifungal spectrum are different. They are highly stable molecules. Furthermore, they proved to be non-toxic to plant and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*; they can interact synergistically with other antifungal compounds. These features make them promising compounds for further basic studies (such as structure-antifungal effect relationship studies), or applied researches (such as the development of protein-based antifungal compounds to be applied in medicine, plant protection or food preservation).

In the genome of the *Neosartorya fischeri* isolate NRRL 181, a gene encoding a hypothetical protein was identified (NCBI ID: XM_001262585), which proved to be a putative defensin-like antimicrobial protein (*N. fischeri* antimicrobial protein, NFAP) based on *in silico* investigations.

The aims of the present study were the followings:

1. Isolation of the putative NFAP encoding gene from *N. fischeri* NRRL 181 isolate.
2. Isolation of the NFAP.

3. Investigation of the *in silico* structure and phylogenetic relationships of the NFAP.
4. Determination of the *in vitro* antimicrobial properties of NFAP.
5. Examination of mode of action of the NFAP.
6. Investigation of the biological role of the NFAP.

We isolated the *nfap* gene from *N. fischeri* NRRL 181 isolate via PCR experiments. Based on *in silico* investigations, the low molecular mass (6.6255 kDa), extracellular, cationic (pI=8.93), cysteine rich mature NFAP consists of 57 amino acid residues. The amino acid sequence of the mature protein shows 10.3-22.8% homology to similar proteins described in literature. Further *in silico* investigations revealed that the tertiary structure of the NFAP is similar to the β -defensin-like molecules: 5 β -sheets connected with loops and stabilised by three disulfide bridges.

The phylogenetic relationships between the isolated and putative defensin-like proteins from Ascomycetes were investigated. Our detailed analysis on the amino acid sequences confirmed that the β -defensin-like antifungal peptides with PAF-cluster are separated from the similar peptides with BP-cluster as described previously that besides the two groups of defensin-like proteins with PAF-cluster or BP-cluster, and a putative defensin-like protein produced by *Botryotinia fuckeliana* represent a new group. Based on the primary protein structure, it seems that phylogenetically NFAP is located between the *P. chrysogenum* PAF and *A. niger* ANAFP and closely related to *A. giganteus* AFP.

The analysis of the promoter region of *nfap* revealed the presence of several putative regulatory elements that might be involved in the transcriptional regulation of *nfap* in response to environmental signals and stress. Considering these elements, a medium was optimized for the production of NFAP. After the purification of the ferment broth, a ~6.6 kDa protein was isolated from the antifungally active fractions. This protein was named as *N. fischeri* antifungal protein (NFAP, EMBL ID: CAQ42994). The first 6 amino acid residues of this protein were identified with N-terminal sequencing, which corresponded well to the *in silico* determined sequence of the mature NFAP. The purification of NFAP was optimised. The final amount of the purified NFAP from 1000 ml ferment broth was 1250 \pm 123 μ g.

We examined the antifungal activity of the NFAP in 96-well microtiter plate bioassays. Among the five zygo- and five ascomycetous fungal strains tested in the sensitivity assays, two isolates belonging to Ascomycetes (*A. niger* and *Aspergillus nidulans*) and one belonging to Zygomycetes (*Rhizomucor miehei*) proved to be

susceptible to NFAP in the applied concentration range (12.5-200 µg/ml). NFAP acted in dose-dependent manner similar to the homologous proteins: In the case of *A. niger*, we demonstrated that the growth inhibitory effect of NFAP at sublethal concentration (100 µg/ml) turned into fungicidal at its higher dose (200 µg/ml). The manifestation of the antifungal effect of NFAP is similar to that observed in the case of the related proteins *A. giganteus* AFP and *P. chrysogenum* PAF: NFAP also caused inhibition of spore germination and delayed, distorted and retarded hyphae lengthening. *Absidia corymbifera*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Mortierella wolfii*, *Mucor piriformis*, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* and *Trichoderma longibrachiatum* were not susceptible in the applied *in vitro* antifungal tests. Effect of different pH and temperature conditions on the biological activity of the NFAP was investigated in agar diffusion test against *A. niger*. NFAP showed the highest antifungal activity at pH 8.4-8.6, but it was maintained in different rate under all investigated pH conditions (pH 7.0-9.0). NFAP proved to be stable even after a temperature treatment at 100 °C for 30 minutes, and the antifungal effect of the treated protein remained after 120 h of incubation at 25 °C. Antifungal activity after treatment at 100 °C for 40 minutes was not observed.

We carried out the heterologous expression of NFAP in *A. nidulans* CS2902 strain. The *A. nidulans* strain, which previously proved to be slightly susceptible to NFAP, produced the protein constitutively and in active form. The yield of the expression system was similar to the native producer (1680±223 µg from 1 l ferment broth) due to the self-poisoning effect. Delayed and abnormal spore germination was observed in the case of NFAP-secreting transformants compared to the non-secreting *A. nidulans* CS2902 strain: conidiospores formed very short, swelled hyphae with multiple branches. This self-poisoning effect depended on the amount of conidia used for the inoculation: there were no significant differences in the hyphal growth up to 10⁴ conidia, but at 10⁵ conidia a significant reduction, and at 10⁶ conidia a total self-killing effect was observed. Effect of the produced NFAP on the germination of *A. nidulans* CS2902 conidia was investigated with scanning electron microscopy (SEM), 4'-6-diamidino-2-phenylindole- (DAPI) and calcofluor white- (CFW) staining. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate-staining and Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit were used for revealing the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and the possible apoptotic, necrotic effect. The impact of mono- and divalent cations on the antimicrobial activity of NFAP was also examined. The hyphal growth reduction effect of NFAP was absent in the presence of mono- and divalent

cations (50 and 100 mM KCl, Mg₂SO₄, Na₂SO₄). Damage in the organization of cell-wall, destruction of chitin filaments and accumulation of nuclei at the broken hyphal tips were detected by SEM, DAPI- and CFW-staining. Similar phenomenon was observed at the related peptide, *A. giganteus* AFP. Accumulation of ROS and more frequent apoptotic, necrotic events were also observed in the case of the NFAP-producing *A. nidulans* strain. Similar effect was previously described for the *P. chrysogenum* PAF treatment of *A. nidulans*.

We created the *nfap*-deletion mutant strain of the *N. fischeri* NRRL 181, and we analysed its growth in minimal and complete medium compared to the wild-type. We also examined the *in vitro* antagonism ability (via calculation of *in vitro* antagonism index, IVAI) of the wild type and the Δ *nfap* mutant strains against possible competitor fungal isolates belonging to Zygo- and Ascomycetes. We observed that the Δ *nfap* strain shows slower growth than the wild-type in minimal medium, indicating that NFAP could have an impact on the fungal growth in the presence of nutrient limitation. Compared to the Δ *nfap* strain, the wild-type effectively inhibited the growth of NFAP-sensitive fungal isolates. This difference in the *in vitro* antagonism ability is prevailed strongly in minimal medium. If both types of *N. fischeri* showed inhibition effect against the competitor fungal isolate, the IVAI value of the Δ *nfap* strain was lower. Based on these observations, NFAP could play a role in the emulation for nutrients and habitat against fungi with similar ecological niche and in the fungal growth in the presence of nutrient limitation.

Our results broaden the number of the isolated and characterised defensin-like antifungal proteins produced by filamentous fungi. Based on its observed features, NFAP could be a suitable compound for practical application, and serves as a basis for the design of new synthetic antifungal protein analogues in the near future after investigation of its antimicrobial spectrum, exact mode of action and structure-antifungal effect relationships.

9. Irodalomjegyzék

- Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:35-54.
- Aerts AM, Carmona-Gutierrez D, Lefevre S, Govaert G, Francois IE, Madeo F, Santos R, Cammue BP, Thevissen K. The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. FEBS Lett. 2009;583:2513-2516.
- Aerts AM, Bammens L, Govaert G, Carmona-Gutierrez D, Madeo F, Cammue BP, Thevissen K. The antifungal plant defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. Front. Microbiol. 2011;2:47.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215:403-410.
- Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. Syst Biol. 2006;55:539-552.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a webbased environment for protein structure homology modeling. Bioinformatics. 2006;22:195-201.
- Ballance DJ. Sequences important for gene expression in filamentous fungi. Yeast. 1986;2:229-236
- Barakat H, Spielvogel A, Hassan M, El-Desouky A, El-Mansy H, Rath F, Meyer V, Stahl, U. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* prevents secondary growth of different *Fusarium* species on barley. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;87:617-624.
- Barna B, Leiter É, Hegedűs N, Bíró T, Pócsi I. Effect of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) on barley powdery mildew and wheat leaf rust pathogens. 2008;48:516-520.
- Batta Gy, Barna T, Gáspári Z, Sándor Sz, Kövér KE, Binder U, Sarg B, Kaiserer L, Chhillar AK, Eigentler A, Leiter É, Hegedűs N, Pócsi I, Lindner H, Marx F. Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF - a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. FEBS J. 2009;276:2875-2890.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol. 2004;340:783-795.

- Beuchat LR. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. *J Food Sci.* 1986;51:1506-1510.
- Binder U, Oberparleiter C, Meyer V, Marx F. The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 2010a;75:294-307.
- Binder U, Chu M, Read ND, Marx F. The antifungal activity of the *Penicillium chrysogenum* protein PAF disrupts calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2010b;9:1374-1382.
- Binder U, Bencina M, Eigentler A, Meyer V, Marx F. The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFP_{NN5353} activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis. *BMC Microbiol.* 2011;11:209.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:238-250.
- Campos-Olivas R, Bruix M, Santoro J, Lacadena J, Martínez del Pozo Á, Gavilanes JG, Rico M. NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. *Biochemistry.* 1995;34:3009-3021.
- Cheng J, Randall AZ, Sweredoski MJ, Baldi P. SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:W72-76 [WebServer issue].
- Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Chisten R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:439.
- Coca M, Bortolotti C, Rufat M, Penas G, Eritja R, Tharreau D, Martínez del Pozo Á, Messeguer J, San Segudo B. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol Biol.* 2004;54:245-259.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. Phy-logeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:W465-469.
- Dereeper A, Audic S, Claverie JM, Blanc G. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol.* 2010;10:8.
- Duchon CE. Lanczos filtering in one and two dimensions. *J Appl Meteorol.* 1979;18:1016-1022.

- Emri T, Molnár Z, Szilágyi M, Pócsi I. Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. Appl. Biochem. Biotechnol. 2008;151:211-220.
- Epand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. Biochim Biophys Acta. 1999;1426:11-28.
- Galgóczy L, Papp T, Leiter É, Marx F, Pócsi I, Vágvölgyi Cs. Sensitivity of different Zygomycetes to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF). J Basic Microbiol. 2005;45:136-141.
- Galgóczy L, Papp T, Lukács Gy, Leiter É, Pócsi I, Vágvölgyi Cs. Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. FEMS Microbiol Lett. 2007;270:109-115.
- Galgóczy L, Papp T, Pócsi I, Hegedűs N, Vágvölgyi Cs. *In vitro* activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. Anton Leeuw Int J G. 2008;94:463-470.
- Galgóczy L, Virágh M, Kovács L, Tóth B, Papp T, Vágvölgyi Cs. Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among Fusaria. Peptides. 2013;39:131-137.
- Gams W, Christensen M, Onions AH, Pitt JI, Samson RA. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson RA, Pitt JI., (eds), Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics. New York: Plenum Press. 1985;55-62.
- Ganz T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. Nature Rev Immunol. 2003;3:710-720.
- García-Rico RO, Fierro F, Martín JF. Heterotrimeric Gα protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum* controls conidiation mainly by a cAMP-independent mechanism. Biochem Cell Biol. 2008;86:57-69.
- Geisen R. *P. nalgiovense* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. Int J Food Microbiol. 2000;62:95-101.
- Girardin H, Monod M, Latge J-P. Molecular characterization of the food-borne fungus *Neosartorya fischeri* (Malloch and Cain). Appl Environ Microbiol. 1995;61:1378-1383.
- Girgi M, Breese WA, Lörz H, Oldach KH. Rust and downy mildew resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) mediated by heterologous expression of the *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. Transgenic Res. 2006;15:313-324.

- Gori S, Pellegrini G, Filipponi F, Capanna SD, Biancofiore G, Mosca F, Lofaro A. Pulmonary aspergillosis caused by *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischerians*) in a liver transplant recipient. J Med Mycol. 1998;8:105-107.
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol. 2003;52:696-704.
- Hagen S, Marx F, Ram AF, Meyer V. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. Appl Environ Microbiol. 2007;73:2128-2134.
- Hajji M, Jellouli K, Hmidet N, Balti R, Sellami-Kamoun A, Nasri M. A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization. J Ind Microbiol Biotechnol. 2010;37:805-813.
- Hall TA. BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 1999;41:95-98.
- Hegedűs N, Sigl C, Zadra I, Pócsi I, Marx F. The *paf* gene product modulates asexual development in *Penicillium chrysogenum*. J Basic Microbiol. 2011a;51:253-262.
- Hegedűs N, Leiter É, Kovács B, Tomori V, Kwon NJ, Emri T, Marx F, Batta G, Csernoch L, Haas H, Yu JH, Pócsi I. The small molecular mass antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* – a mechanism of action oriented review. J Basic Microbiol. 2011b;51(6):561-571.
- Hegedűs N, Marx F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? Fungal Biology Reviews. 2013;26:132-145.
- Jacobs M. The regulation of expression of a gene encoding an antifungal-protein of *Aspergillus giganteus* and its heterologous expression in yeast and plant. Thesis. TU Berlin. 1995.
- Kaiserer L, Oberparleiter C, Weiler-Görz R, Burgstaller W, Leiter É, Marx F. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. Arch Microbiol. 2003;180:204-210.
- Kavanagh J, Larchet N, Stuart M. Occurrence of a heat-resistant species of *Aspergillus* in canned strawberries. Nature. 1963;198:1322.
- Ko LJ, Engel JD. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. Mol Cell Biol. 1993;13:4011-4022.
- Korneva EA, Kokryakova VN. Defensins: Antimicrobial peptides with a broad spectrum of biological activity. Neuro Immun Biol. 2003;3:451-462.

- Krizsán K, Bencsik O, Nyilasi I, Galgóczy L, Vágvölgyi Cs, Papp T. Effect of the sesterterpene-type metabolites, ophiobolin A and B, on zygomycetes fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 2010; 313:135-140.
- Lacadena J, Martínez del Pozo Á, Gasset M, Patino B, Campos-Olivas R, Vazquez C, Martinez-Ruiz A, Mancheno JM, Onaderra M, Gavilanes JG. Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch Biochem Biophys.* 1995;324:273-281.
- Lee GD, Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL, Hahm KS. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263:646-651.
- Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol.* 1999;11:23-27.
- Leiter É, Szappanos H, Oberparleiter C, Kaiserer L, Csernoh L, Pusztahelyi T, Emri T, Pócsi I, Salvenmoser W, Marx F. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2445-2453.
- Li S, Du L, Yuen G, Harris SD. Distinct ceramide synthases regulate polarized growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell.* 2006;17:1218-1227.
- Lonial S, Williams L, Carrum G, Ostrowski M, McCarthy PJr. *Neosartorya fischeri*: an invasive fungal pathogen in an allogeneic bone marrow transplant patient. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:753-755.
- López-García B, Moreno AB, San Segundo B, De los Ríos V, Manning JM, Gavilanes JG, Martínez del Pozo Á. Production of the biotechnologically relevant AFP from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2010;70:206-210.
- Martín-Urdiroz M, Martínez-Rocha AL, Di Pietro A, Martínez del Pozo Á, Roncero MI. Differential toxicity of antifungal protein AFP against mutants of *Fusarium oxysporum*. *Int Microbiol.* 2009;12:115-121.
- Martínez del Pozo Á, Lacadena V, Mancheno JM, Olmo N, Onaderra M, Gavilanes JG. The antifungal protein AFP of *Aspergillus giganteus* is an oligonucleotide/oligosaccharide binding (OB) fold-containing protein that produces condensation of DNA. *J Biol Chem.* 2002;277:46179-46183.

- Martínez-Ruiz A, Martínez del Pozo Á, Lacadena J, Mancheño JM, Oñaderra M, Gavilanes JG. Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1340:81-87.
- Marx F, Haas H, Reindl M, Stöffler G, Lottspeich F, Redl B. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene, encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene*. 1995;167:167-171.
- Marx F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;65:133-142.
- Marx F, Binder U, Leiter É, Pócsi I. The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:445-454.
- Meyer V, Wedde M, Stahl U. Transcriptional regulation of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *Mol Genet Genomics*. 2002a;266:747-757.
- Meyer V, Stahl U. New insights in the regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet*. 2002b;42:36-42.
- Meyer V, Stahl U. The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *J Basic Microbiol*. 2003;43:68-74.
- Meyer V. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;78:17-28.
- Moreno AB, Martínez del Pozo Á, Borja M, San Segudo B. Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 2003;93:1344-1353.
- Moreno AB, Peñas G, Rufat M, Bravo JM, Estopa M, Messeguer J, San Segundo B. Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice. *Mol Plant Microbe Interact*. 2005;18:960-972.
- Moreno AB, Martínez del Pozo Á, Segundo BS. Biotechnologically relevant enzymes and proteins. Antifungal mechanism of the *Aspergillus giganteus* AFP against the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;72:883-895.

- Nielsen PV, Beuchat LR, Frisvad JC. Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54:1504-1510.
- Nielsen PV, Beuchat LR, Frisvad JC. Influence of atmospheric oxygen content on growth and fumitremorgin production by a heat-resistant mold *Neosartorya fischeri*. *J Food Sci.* 1989;54:679-682.
- Oldach KH, Becker D, Lörz H. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001;14:832-838.
- Oshero N, May G. Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics.* 2000;155:647-656.
- Palicz Z, Jenes A, Gáll T, Miszt-Blasius K, Kollár S, Kovács I, Emri M, Márián T, Leiter E, Pócsi I, Csósz E, Kalló G, Hegedűs C, Virág L, Csernoch L, Szentesi P. *In vivo* application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;269:8-16.
- Peberdy JF. Extracellular proteins in fungi: a cytological and molecular perspective. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 1999;46:165-174.
- Pokorska A, Drevet C, Scazzocchio C. The analysis of the transcriptional activator PrnA reveals a tripartite nuclear localisation sequence. *J Mol Biol.* 2000;298:585-596.
- Raper KB, and Fennell DI. *The Genus Aspergillus* (Baltimore: Williams & Wilkins). 1965.
- Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ, Asensio MA. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides.* 2010;31:541-547.
- Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol.* 2007;59:147-203.
- Seibold M, Wolschann P, Bodevin S, Olsen O. Properties of the bubble protein, a defensin and an abundant component of a fungal exudate. *Peptides.* 2011;32:1989-1995.
- Selitrennikoff CP. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:2883-2894.
- Skouri-Gargouri H, Gargouri A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. *Peptides.* 2008;29:1871-1877.
- Skouri-Gargouri H, Ben Ali M, Gargouri A. Molecular cloning, structural analysis and modelling of the AcAFP antifungal peptide from *Aspergillus clavatus*. *Peptides.* 2009;30:1798-1804.

- Skouri-Gargouri H, Jellouli-Chaker N, Gargouri A. Factors affecting production and stability of the AcAFP antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;86:535-543.
- Szappanos H, Szigeti GyP, Pál B, Rusznák Z, Szűcs G, Rajnavölgyi É, Balla J, Balla Gy, Nagy E, Leiter É, Pócsi I, Marx F, Csernoch L. The *Penicillium chrysogenum*-derived antifungal peptide shows no toxic effects on mammalian cells in the intended therapeutic concentration. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2005;371:122-132.
- Szappanos H, Szigeti GyP, Pál B, Rusznák Z, Szűcs G, Rajnavölgyi É, Balla J, Balla Gy, Nagy E, Leiter É, Pócsi I, Hagen S, Meyer V, Csernoch L. The antifungal protein AFP secreted by *Aspergillus giganteus* does not cause detrimental effects on certain mammalian cells. Peptides. 2006;27:1717-1725.
- Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, Manczinger L, Vágvolgyi C. A novel, image analysis-based method for the evaluation of *in vitro* antagonism. J. Microbiol. Methods. 2006;65:619-622.
- Thevissen K, Ferket KK, Francois IE, Cammue BP. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. Peptides. 2003;24:1705-1712.
- Theis T, Wedde M, Meyer V, Stahl U. The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:588-593.
- Theis T, Stahl U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. Cell Mol Life Sci. 2004;61:437-455.
- Theis T, Marx F, Salvenmoser W, Stahl U, Meyer V. New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. Res Microbiol. 2005;156:47-56.
- Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K. Plant defensins. Planta. 2002;216:193–202.
- Vila L, Lacadena V, Fontanet P, Martínez del Pozo Á, San Segundo B. A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. Mol Plant Microbe Interact. 2001;14:1327-1331.
- Wakana D, Hosoe T, Itabashi T, Nozawa K, Okada K, Takaki GMdC, Yaguchi T, Fukushima K, Kawai KI. Isolation of isoterrein from *Neosartorya fischeri*. Mycotoxins. 2006;56:3-6
- Watanabe K, Harayama S. SWISS-PROT: the curated protein sequence database on Internet. Tanpakushitsu Kakusan Koso 2001;46:80-86.

- White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol.* 1995;5:521-527.
- Wnendt S, Ulbrich N, Stahl U. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal protein from *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet.* 1994;25:519-523.
- Wong SM, Musza LL, Kydd GC, Kullnig R, Gillum AM, Cooper R. Fiscalins: new substance P inhibitors produced by the fungus *Neosartorya fischeri*. Taxonomy, fermentation, structures, and biological properties. *JAntibiot.* 1993;46:545-553.
- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharm Rev.* 2003;55:27-55.
- Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* 2004;41:973-981.

10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, hogy lehetővé tette szakdolgozóként és doktoranduszként végzett munkámat az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékén. Köszönetemet fejezem ki témavezetői munkájáért, hasznos szakmai tanácsaiért, támogatásáért.

Külön köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Galgóczi Lászlót, hogy folyamatosan és lelkiismeretesen figyelemmel kísérte és segítette munkámat, áldozatos munkája, szakmai tanácsai és bátorítása nagyban hozzájárultak a dolgozat elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Papp Tamásnak a hasznos szakmai diskusszióért, tanácsaiért.

Köszönet illeti Dr. Takó Miklóst a fehérjemunkák kivitelezésében nyújtott segítségéért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Hamari Zsuzsannának és Karácsony Zoltánnak a transzformálás kivitelezése során nyújtott hasznos segítségükért.

Köszönet illeti Prof. Mag. Dr. Florentine Marx-Ladurnert, aki szívesen fogadott kutatócsoportjában és támogatott szakmai előrehaladásomban.

Szeretnék köszönetet mondani Virágh Máténak, Homa Mónikának, Tóth Liliánának, Dr. Kocsubé Sándornak és Petkovits Tamásnak és Nacsa-Farkas Elvirának a kísérleti munkák során nyújtott segítségükért, támogatásukért.

Köszönetemet fejezem ki a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék összes dolgozójának, akik munkájukkal, tanácsaikkal segítettek dolgozatom elkészítésében.

Az Innsbrucki Orvosi Egyetemen töltött kutatói ösztöndíjat az Osztrák-Magyar Akció Alapítványnak köszönhetem.

Külön köszönettel tartozom a családomnak, akik szerető támogatásukkal biztosították a dolgozat elkészülését.